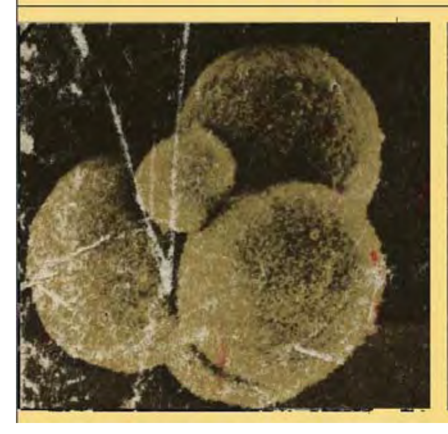
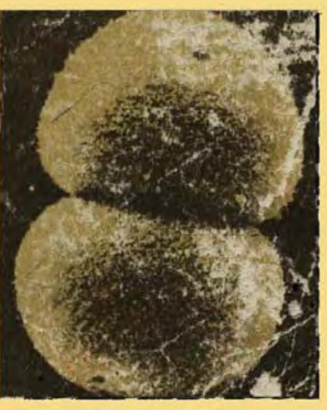
Б. Албертс
Д. Брей
Дж. Льюис
М. Рэфф
К. Робертс
Дж. Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

1

Издательство «Мир»





Молекулярная биология клетки

Molecular
Biology
of the Cell

Bruce Alberts, Dennis Bray,
Julian Lewis, Martin Raff,
Keith Roberts, James D. Watson

SECOND EDITION

Garland Publishing, Inc.
New York London

Б. Албертс
Д. Брей
Дж. Льюис
М. Рэфф
К. Робертс
Дж. Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

2-е ИЗДАНИЕ, ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ

В 3-х томах

1

Перевод с английского

канд. биол. наук Т.Н. Власик
канд. биол. наук В. П. Коржа,
канд. биол. наук В.М. Маресина,
Т.Д. Аржановой, Г. В. Крюковой

под редакцией акад. Г. П. Георгиева,
д-ра биол. наук Ю.С. Ченцова



Москва **«Мир»** **1994**

ББК 28.070
М75
УДК 576.32/36

Федеральная целевая программа книгоиздания России

Авторы: Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.
Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд., перераб. М75 и доп. Т. 1. Пер. с англ.-М.: Мир, 1994.-517 с., ил.
ISBN 5-03-001985-5

Созданный коллективом известных американских ученых (в их числе - лауреат Нобелевской премии Джеймс Уотсон) современный учебник молекулярной биологии. Энциклопедическая полнота охвата материала позволяет использовать его как справочное пособие. На русском языке выходит в 3-х томах. Читатель уже знаком с 1-м изданием (М.: Мир, 1986-1987). Новое издание переработано авторами и дополнено современным материалом. В т. 1 рассматриваются эволюция клеток, их химический состав, методы исследования, структура и функции плазматической мембраны, митохондрий, хлоропластов.

Для биологов всех специальностей, преподавателей и студентов университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

$$M\frac{1903010000-023}{056(01)-94}КБ\ 46-92-29$$

ББК 28.070

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001986-3 (русск.)
ISBN 5-03-001985-5

ISBN 0-8240-3695-6 (англ.)

Предисловие редактора перевода

Книга Б. Албертса, Д. Брея, Дж. Льюиса, М. Рэффа и Дж. Уотсона «Молекулярная биология клетки» вышла в русском переводе в 1986-1987 гг. и сразу же завоевала широкое признание и популярность среди отечественных биологов. Трудно переоценить значение этой книги для студентов и аспирантов, использующих ее в качестве учебника.

Не вызывает сомнения, что второе издание «Молекулярной биологии клетки», выпущенное теми же авторами в 1989 г., также будет очень полезно как для биологов, так и для медиков нашей страны. Шесть лет, разделяющие эти книги, оказались весьма плодотворными для биологии в целом; были получены новые фундаментальные данные, решены многие спорные вопросы, появились новые научные представления в области молекулярной биологии, цитологии, биологии развития, клеточной иммунологии и нейробиологии. Авторы книги существенно переработали ее содержание, привели его в соответствие с современным уровнем знаний.

Общая композиция книги не изменилась, однако в ней появились две новые главы: контроль генной активности (гл. 10) и рак (гл. 21). Внесены изменения в порядок расстановки глав, что делает изложение материала более логичным. Так, глава 7, посвященная биоэнергетике, закономерно следует за материалом, связанным со строением мембран, а после главы «Клеточное ядро» следует глава о генной экспрессии.

Значительно обновлена глава 8, посвященная внутриклеточным органеллам, теперь она называется «Внутриклеточная сортировка макромолекул и внутриклеточные компартменты». В нее введен анализ молекулярных основ сортировки лизосомных и секреторных белков.

Большое внимание в книге уделено современным методам молекулярной и клеточной биологии. Авторы стремятся показать как, каким способом, с помощью какого рода экспериментов получены те или иные данные. Это стремление связать конкретный материал с логикой эксперимента имеет большое педагогическое значение.

Предлагаемое второе издание «Молекулярной биологии клетки» можно рекомендовать в качестве основного учебника для студентов и аспирантов молекулярно-биологического профиля, а также для слушателей курсов по таким специальностям, как цитология, генетика, гистология, эмбриология, общая физиология и др. Более того, знакомство с этой книгой биолога любой специальности значительно расширит его кругозор и обновит представления о молекулярной, клеточной и тканевой организации живой природы.

Ю. С. Ченцов

Предисловие ко второму изданию

Более 50 лет назад Уилсон писал, что «ключ к решению любой биологической проблемы в конечном счете следует искать в клетке». Однако до недавнего времени биология клетки преподавалась в вузах как специализированный второстепенный курс, основанный главным образом на электронной микроскопии. А в большинстве медицинских вузов многие разделы клеточной биологии - такие, как механизмы эндоцитоза, хемотаксис, движение клеток и клеточная адгезия - вообще почти не изучались. Их считали слишком «клеточными» для курса биохимии и слишком «молекулярными» для курса гистологии. Однако, в связи с огромными успехами, достигнутыми клеточной биологией в последнее время, она начинает занимать по праву принадлежащее ей центральное место в биологическом и медицинском образовании. Все больше университетов вводят ее как обязательный годичный курс для всех студентов, обучающихся по специальности «биология» или «биохимия». Клеточная биология становится также общеобразовательной дисциплиной для первого курса большинства медицинских вузов. Первое издание *«Молекулярной биологии клетки»* появилось в преддверии этих остро необходимых реформ, и, как мы надеялись, должно было им способствовать. Мы будем удовлетворены, если второе издание поможет углубить эти реформы и ускорить их проведение.

Перерабатывая книгу, мы обнаружили лишь несколько примеров, когда новые открытия начисто опровергли старые представления. Но за шесть лет, прошедших со времени выхода в свет первого издания, было получено очень много новых данных; они выявили новые связи между различными вопросами и во многих местах радикально изменили акценты. Таким образом, во втором издании книга серьезно переработана: каждая глава претерпела существенные изменения, многие разделы были почти целиком переписаны заново, добавлены две новые главы, посвященные контролю экспрессии генов и проблеме рака.

Некоторые читатели первого издания, особенно преподаватели, предлагали давать более подробное описание экспериментов, подтверждающих обсуждаемые теории. Нам не хотелось разрывать повествование и увеличивать объем и без того уже очень большой книги, но мы согласны с тем, что студентам необходимо понимать, как сделаны открытия, описываемые в книге. С этой целью Джон Уилсон и Тим Хант составили сборник задач по молекулярной биологии. Каждый раздел этого сборника соответствует определенному разделу «Молекулярной биологии клетки» и посвящен главным образом экспериментам, описанным в соответствующей оригинальной литературе. Это служит основой для разбора ряда вопросов - как несложных, так и более трудных - предназначенных для активного вовлечения читателя в обсуждение, лежащее в основе открытия.

Второе издание, как и первое, готовилось долго. Как и прежде, каждая глава переходила от автора, написавшего первый черновик, к остальным авторам для критических замечаний и активного пересмотра. Поэтому каждая часть этой книги представляет собой совместное произведение. В этом общем деле нам часто помогали Тим Хант и Джон Уилсон. При решении вопроса о необходимости пересмотра того или иного раздела мы пользовались услугами независимых экспертов. Мы особенно благодарны Джеймсу Ротману (Принстонский университет) за его вклад в главу 8, и Джереми Хеймсу (Лондонский университетский колледж), Тилсу Митчисону (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Паулю Рэрсу (Оксфордский университет) за работу над главой 13. Все разделы уже переработанного текста просматривались независимыми экспертами, чьи комментарии и предложения были неоценимы.

Главную роль в создании книги, пригодной для чтения, вновь сыграла Миранда Робертсон. Она добивалась того, чтобы каждая фраза была ясной и логичной, и переписывала многие страницы, не обладавшие этими качествами. Мы также благодарны сотрудникам издательства Garland Publishing, в особенности Рут Адаме, Алисону Уолкеру и Гэвину Бордену, за их доброту, юмор, трудолюбие и большую помощь, которую они оказывали нам на протяжении четырех лет, потребовавшихся для подготовки этого издания. Особенную благодарность мы приносим Кэрол Уинтер за ее кропотливый труд при перепечатке всей книги и подготовке дискет к печати. Наконец, мы благодарны нашим женам, семьям, коллегам и студентам и приносим им извинения за недостаток внимания в течение нескольких лет, без их помощи и терпения эта книга никогда не была бы написана.

Предисловие к первому изданию

Научное познание таит в себе парадокс. Из хаоса фактов, накопленных в стремительном потоке информации, рождается неожиданно простое объяснение ранее загадочных явлений. Так постепенно обнажается сама суть вещей. Современная клеточная биология может служить тому примером. Использование новейших методов молекулярной биологии позволило увидеть изумительное изящество и экономичность процессов, протекающих в живых клетках, и замечательное единство принципов их функционирования. Стремясь донести суть этих принципов до читателя, авторы были далеки от мысли создать энциклопедию научных сведений, напротив, нам хотелось бы предоставить возможность поразмыслить над имеющимися фактами. Безусловно, в биологии клетки все еще остаются неизученными обширные области, и многие известные факты до сих пор не получили объяснения. Но эти нерешенные проблемы как раз и являются наиболее волнующими, и мы старались так их изложить, чтобы побудить читателей включиться в поиски решения неясных вопросов. Поэтому, касаясь малоизученных областей, мы вместо простого изложения фактов часто брали на себя смелость высказывать гипотезы, отдавая их на суд читателя и надеясь на критическое отношение к ним.

В книге «Молекулярная биология клетки» рассматриваются главным образом эукариотические клетки, а не бактерии. Название книги отражает первостепенное значение подходов, определяемых молекулярным уровнем исследования. Именно с позиций молекулярной биологии и рассматриваются клетки в первых двух частях книги, содержание которых в совокупности соответствует традиционным курсам биологии клетки. Но одной молекулярной биологии недостаточно. Эукариотические клетки, из которых состоят многоклеточные животные и растения, - это в высшей степени «социальные» организмы: они живут благодаря кооперированию и специализации. Чтобы понять, как они функционируют, необходимо исследовать роль и место клеток в многоклеточных сообществах, а также узнать, как функционируют изолированные клетки данного типа. Это два совершенно различных, но глубоко взаимосвязанных уровня исследования. Поэтому часть III книги посвящена поведению клеток в организме многоклеточных животных и растений. Таким образом, проблемам биологии развития, гистологии, иммунологии и нейробиологии уделено здесь гораздо больше внимания, чем в других учебниках по биологии клетки. Хотя в основном курсе основ биологии клетки этот материал может рассматриваться как факультативный или дополнительный, он представляет собой важный раздел науки о клетках и должен быть особенно интересен тем, кто решил продолжить изучение биологии или медицины. Широкий охват тем в книге отражает наше убеждение, что в современном биологическом образовании курс биологии клетки должен занимать центральное место.

Книга предназначена в основном для студентов, биологов или медиков, впервые систематически изучающих биологию клетки. Мы предполагаем, что большинство читателей знакомы по крайней мере с вводным курсом биологии, тем не менее мы старались написать книгу так, чтобы даже не знакомый *с* биологией читатель мог ее понять, при условии что начнет читать книгу с первых страниц. Наряду с этим мы надеемся, что книга окажется полезной и для научных работников, нуждающихся в руководстве, которое помогло бы им разобраться в обширных областях знаний. Поэтому мы приводим список литературы, значительно более детальный, чем тот, который мог бы понадобиться среднему студенту-дипломнику. В то же время мы старались отобрать лишь те работы, которые можно найти в большинстве библиотек.

Это большая книга, и мы ее долго вынашивали -втрое дольше, чем вынашивается слон и в пять раз дольше, чем вынашивается кит. Многие вложили в нее свой труд. Главы книги неоднократно возвращались к автору, написавшему первый черновой вариант, обсуждались и перерабатывались другими авторами, вновь подвергались критике и переписывались, так что каждая глава книги в своем окончательном виде является результатом объединенных усилий. Кроме Того, часть материала была предоставлена несколькими специалистами, не вхо-

дившими в авторский коллектив. Этот материал был переработан нами и приведен в соответствие с остальными разделами книги. Все главы были дополнительно прочтены специалистами, чьи замечания и поправки трудно переоценить. Пауль Бартон (Канзасский университет), Дуглас Чендлер (Университет штата Аризона), Урсула Гуденоу (Вашингтонский университет), Роберт Поллак (Колумбийский университет), Роберт Сэведж (Свартморовский колледж) и Чарльз Йокум (Мичиганский университет) прочли рукопись полностью или частично и внесли много полезных предложений. Студенты, читавшие рукопись, помогли выявить неясно написанные и трудные для понимания места.

Советы студентов и специалистов собрала и систематизировала в основном Миранда Робертсон. Настояв на том, чтобы каждая страница была ясной и логичной, и переписав страницы, не соответствовавшие этим требованиям, она сыграла главную роль в создании учебника, который студенты прочтут с легкостью. Лидия Мейлим нарисовала многие рисунки к главам 15 и 16. Целый ряд ученых щедро снабдили нас фотографиями - их фамилии указаны в подписях к соответствующим рисункам. Мы благодарим за снисхождение и понимание наших коллег, которым пришлось взять на себя часть наших обязанностей, а также наши семьи и наших студентов, которым мы в течение ряда лет не уделяли должного внимания. Наконец, наш особенно приятный долг - поблагодарить наших редакторов и издателя. Тони Адаме в большой степени способствовал улучшению стиля изложения, а Рут Адаме, чей добрый нрав и высокая работоспособность не раз заставляли авторов краснеть за себя, полностью организовала подготовку издания книги. Гэвин Борден взял на себя труд опубликовать книгу, а его неизменные любезность и радушие сделали для нас работу над книгой и приятной, и полезной с познавательной точки зрения.

Примечание для читателей

Главы этой книги можно читать независимо друг от друга. Тем не менее они расположены в логической последовательности. Первые три главы части I охватывают элементарные принципы и основы биохимии и могут служить введением для изучавших ее. Часть I завершается главой 4, описывающей принципы основных экспериментальных подходов к исследованию клеток. Чтобы освоить материал, изложенный в последующих главах, ее читать необязательно, но учтите, что в ней содержатся полезные справочные данные.

Часть II посвящена центральным вопросам клеточной биологии; в ней рассматриваются общие свойства большинства эукариотических клеток, обсуждаются присущие им молекулярные механизмы наследственности и проблемы клеточной адгезии и внеклеточного матрикса.

Часть III описывает поведение клеток при формировании многоклеточных организмов, начиная с образования яйцеклеток и сперматозоидов и кончая нарушением многоклеточной организации при раковых заболеваниях.

В главе 4 приведено несколько таблиц, в которых перечислены наиболее важные вехи в развитии молекулярной биологии клетки и имена ученых, причастных к этим открытиям. В других разделах книги мы избегаем ссылок на конкретных исследователей. Авторы крупных открытий приведены в списке литературы в конце каждой главы. Этот список как правило включает оригинальные статьи, в которых впервые излагаются важные результаты. Цифры в заголовках текста указывают на номер цитируемой статьи в списке литературы.

Жирный шрифт используется в книге для выделения ключевых терминов в том разделе, где они обсуждаются наиболее полно. Курсивом выделены менее важные термины.

Существенным дополнением к книге служит задачник.[1] Он позволяет оценить изящество экспериментов и изобретательность их авторов. Задачи относятся к центральному разделу книги (гл. 5-14) и тесно связаны с данными, представленными в ней.

Большинство экспериментальных задач освещено в основном тексте. Например, символ 5-4 над заголовком раздела означает, что изложенный в нем материал сформулирован в виде задачи № 4 в главе 5 задачника. Кроме того, каждый раздел задачника начинается серией утверждений с пропущенными словами и верных и неверных вопросов, которые призваны помочь читателю усвоить терминологию и основные концепции, относящиеся к теме. Задачник может быть полезным для самостоятельной работы студентов и семинарских занятий. Он может также использоваться преподавателями во время экзаменов.

---

[1] **Уилсон Дж., Хант Т. Молекулярная биология клетки. Сборник задач.** Пер. с англ. В печати. *Прим. редакции.*

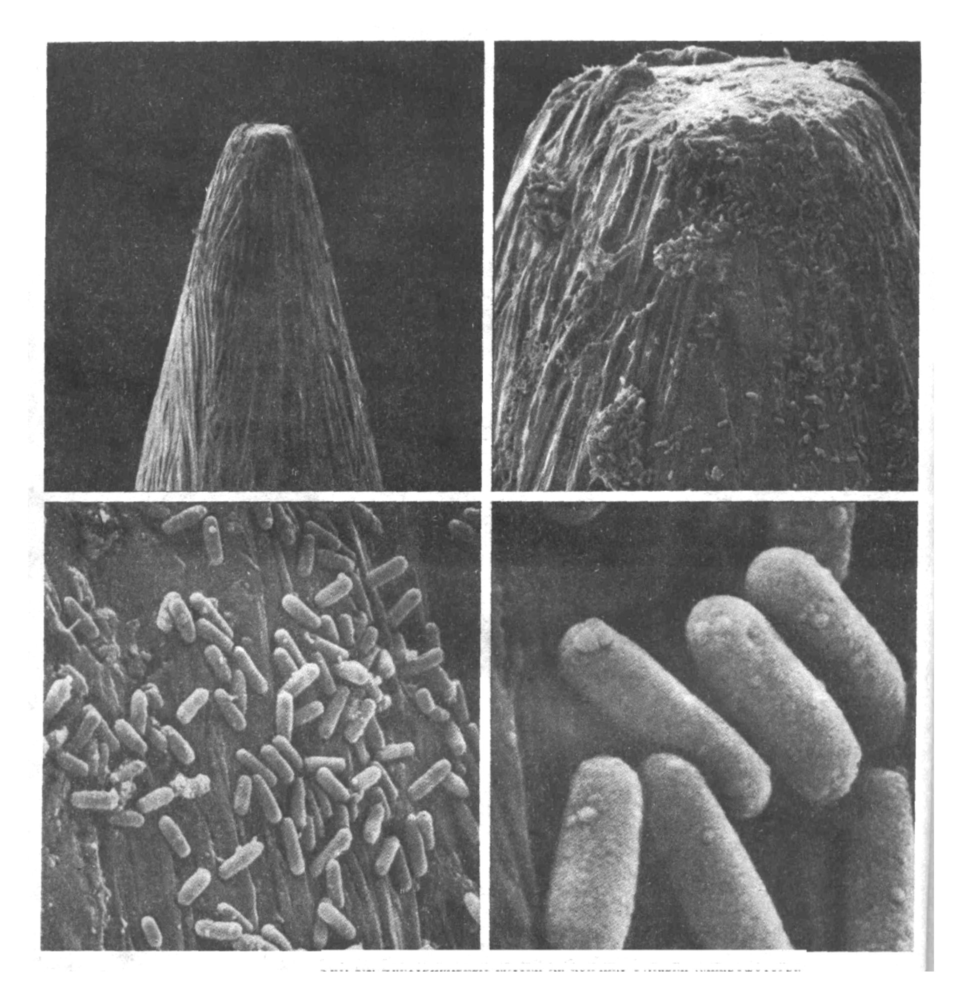


Рис. 1.1. Бактериальные клетки на кончике булавки (микрофотографии сделаны с помощью сканирующего электронного микроскопа). (С любезного разрешения Tony Brain и Science Photo Library.)

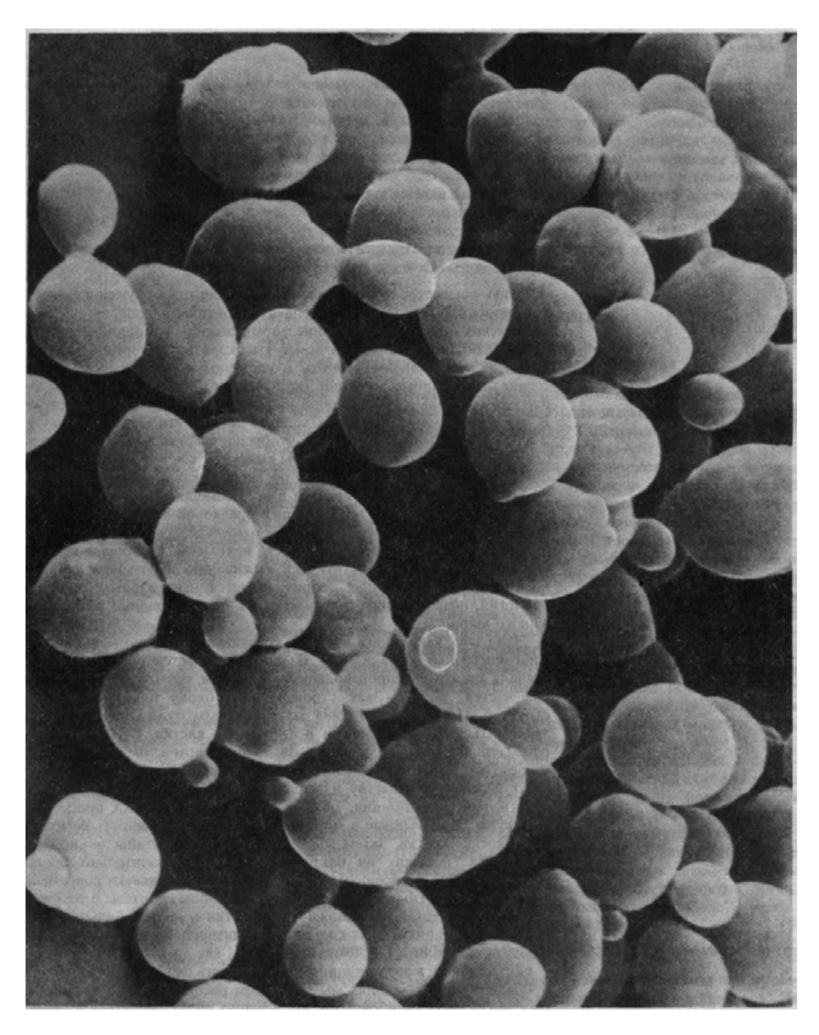


Рис. 1.II. Делящиеся клетки дрожжей (микрофотография сделана с помощью сканирующего электронного микроскопа). (С любезного разрешения Herskowitz и Schabatach.)

1 Эволюция клетки

Все живые существа состоят из клеток - маленьких, окруженных мембраной полостей, заполненных концентрированным водным раствором химических веществ. Простейшие формы жизни - это одиночные клетки, размножающиеся делением. Более высокоразвитые организмы, такие как мы сами, можно сравнить с клеточными городами, в которых специализированные функции осуществляют группы клеток, в свою очередь связанные между собой сложными системами коммуникаций. В известном смысле клетки находятся на полпути между молекулами и человеком. Мы изучаем клетки, чтобы понять, каково их молекулярное строение, с одной стороны, и чтобы выяснить, как они взаимодействуют для образования столь сложного организма, как человек, - с другой.

Считается, что все организмы и все составляющие их клетки произошли *эволюционным* путем от общей предковой клетки. Два основных процесса эволюции - это 1) *случайные изменения* генетической информации, передаваемой от организма к его потомкам, и 2) *отбор* генетической информации, способствующей выживанию и размножению своих носителей. Эволюционная теория является центральным принципом биологии, позволяющим нам осмыслить ошеломляющее разнообразие живого мира.

Эта глава, как и книга в целом, посвящена развитию - от молекул до многоклеточных организмов. В ней обсуждается эволюция клетки, сначала как самовоспроизводящейся единицы, состоящей из более мелких частей, а затем как строительного блока для более крупных структур. По мере изложения материала мы будем последовательно знакомиться с компонентами и функциями клетки, которые детально рассматриваются в следующих главах в основном в том же порядке. Мы узнаем, как свойства больших молекул определенного типа обеспечивают передачу потомству и выражение в фенотипе (экспрессию) наследственной информации, обусловливая эволюционный процесс. Эти молекулы, заключенные в мембрану, составляют сущность самореплицирующейся клетки. Затем мы опишем основные этапы эволюции - от небольших, похожих на бактерии клеток до значительно больших и более сложно устроенных, таких, например, как клетки современных растений и животных. Наконец, будут высказаны гипотезы о том, каким образом отдельные свободноживущие клетки породили большие многоклеточные организмы, как клетки специализировались и как, объединившись, образовали столь сложные органы, как мозг.

Естественно, в эволюционном подходе есть свои опасности: большие пробелы в наших знаниях мы заполняем рассуждениями, детали которых могут быть ошибочными. Не в наших силах вернуться в прошлое и стать свидетелями уникальных молекулярных событий, происходивших миллиарды лет назад. Однако эти древние события оставили много следов, которые мы можем анализировать. Предковые растения, животные и даже бактерии сохранились как ископаемые. Но, что еще более важно, каждый современный организм содержит информацию о призна-

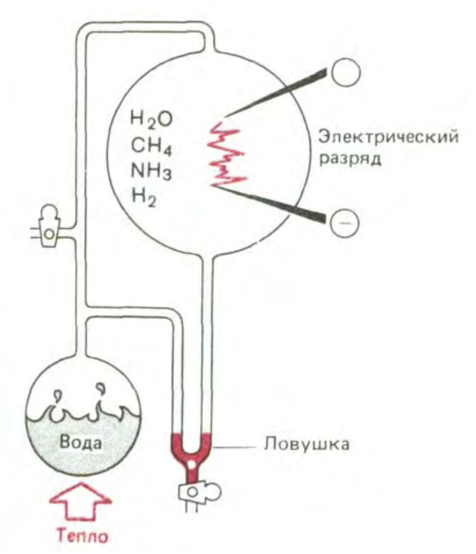


Рис. 1-1. Типичный опыт, имитирующий первозданные условия на Земле. Воду нагревают в герметичном сосуде, содержащем CH_4, NH_3 и H_2. Через смесь газов и водяного пара пропускают электрический разряд. Органические соединения накапливаются в U-образной ловушке.

$HCHO$	Формальдегид
CH_3COOH	Уксусная кислота
NH_2CH_2COOH	Глицин
$HCOOH$	Муравьиная кислота
$CH_3CH(OH)COOH$	Молочная кислота
$NH_2CH(CH_3)COOH$	Аланин
$CH_3NH{-}CH_2COOH$	Саркозин
$H{-}C{\equiv}N$	Синильная кислота
$NH_2{-}C({=}O){-}NH_2$	Мочевина
$NH_2CH(CH_2COOH)COOH$	Аспарагиновая кислота

Рис. 1-2. Некоторые соединения, которые могли образоваться в опыте, описанном на рис. 1-1. Соединения, выделенные цветом, являются важными компонентами современных живых клеток.

ках живых организмов в прошлом. В частности, существующие ныне биологические молекулы позволяют судить об эволюционном пути, демонстрируя фундаментальное сходство между наиболее далекими живыми организмами и выявляя некоторые различия между ними. Анализируя молекулярное подобие и различие, мы пытаемся воссоздать признаки живших некогда существ. Эту задачу можно сравнить с той, которую решает ученый филолог, восстанавливая текст древнего автора, искаженный при неоднократных копированиях и редактированиях. Задача трудна и доказательства несовершенны, и все-таки этот путь дает возможность делать разумные предположения относительно основных стадий в эволюции живых клеток.

1.1. От молекул - к первой клетке

1.1.1. Простые биологические молекулы могут образовываться в пребиотических условиях

Условия, существовавшие на Земле в первый миллиард лет ее истории, все еще являются предметом спора. Мы не знаем, была ли поверхность нашей планеты вначале расплавленной? Содержала атмосфера аммиак или же метан? Можно только предполагать, что Земля была весьма неспокойным местом - с постоянными вулканическими извержениями, неистовыми ливнями и сверкающими молниями. Не было совсем или было очень мало кислорода, и отсутствовал озоновый слой, поглощающий жесткое ультрафиолетовое излучение Солнца.

В таких условиях, очевидно, возникали простые органические (т.е. содержащие углерод) молекулы. Лучшее тому доказательство - лабораторные эксперименты. Если через нагретую смесь воды и газов, таких, как CO_2, CH_4, NH_3 и H_2, пропускать электрический разряд или ультрафиолетовое излучение, они реагируют с образованием малых органических молекул. Обычно набор таких молекул невелик, но каждая образуется в сравнительно больших количествах (рис. 1-1). Среди продуктов есть ряд соединений, таких, как цианистый водород (HCN) и формальдегид (HCHO), которые легко вступают в последующие реакции в водном растворе (рис. 1-2). Наиболее важно, что в эксперименте удается получить четыре основных класса внутриклеточных малых молекул: *аминокислоты, нуклеотиды, сахара* и *жирные кислоты*.

Хотя в таких опытах нельзя точно воспроизвести условия, существовавшие ранее на Земле, они показывают, что органические молекулы образуются на удивление легко. Кроме того, наша формирующаяся планета имела огромные преимущества перед любым экспериментатором: она была очень велика и обеспечивала широкий спектр условий. Но важнее всего то, что в распоряжении Земли были сотни миллионов лет. В таких условиях кажется вполне вероятным, что в какой-то момент, в каком-нибудь месте сконцентрировались многие из простых органических молекул, входящих в состав современных клеток.

1.1.2. Полинуклеотиды способны направлять собственный синтез

Простые органические молекулы, такие, как аминокислоты или нуклеотиды, могут ассоциировать с образованием больших полимеров. Две аминокислоты могут соединиться с помощью пептидной связи, а два нуклеотида могут быть соединены фосфодиэфирной связью. Последовательное повторение этих реакций ведет к образованию линейных полимеров, называемых соответственно **полипептидами и полинуклеотидами.** У современных организмов полипептиды, называемые белками, и полинуклеотиды в форме *рибонуклеиновой кислоты (РНК)* и *дезоксирибонук-*

леиновой кислоты (ДНК) обычно считаются наиболее важными компонентами. Универсальные «кирпичики», из которых состоят белки - это всего лишь 20 аминокислот, а молекулы ДНК и РНК построены только из четырех типов нуклеотидов. Остается лишь гадать, почему именно эти наборы мономеров, а не другие со схожими химическими свойствами были отобраны для биосинтеза.

Самые первые полимеры могли образоваться несколькими путями, например при разогреве сухих органических соединений или в результате каталитического эффекта высоких концентраций неорганических полифосфатов. При проведении аналогичных реакций в пробирке образуются полимеры различной длины со случайной последовательностью, у которых наличие данной аминокислоты или нуклеотида в каждом положении определяется случайно (рис. 1-3). Но если уж полимер образовался, он способен влиять на образование других полимеров. Особенно это относится к полинуклеотидам, которые могут служить матрицей в реакции полимеризации и, таким образом, определять последовательность нуклеотидов в новых полинуклеотидах. Например, полимер, состоящий из одного типа нуклеотидов (полиуридиловой кислоты, или poly U), может служить матрицей для синтеза второго полимера, составленного из другого типа нуклеотида (полиадениловой кислоты, или poly A). Подобные матричные свойства основаны на специфическом, так называемом комплементарном связывании полинуклеотидов друг с другом. Poly U способствует образованию poly A, выстраивая вдоль своей цепи необходимые субъединицы (рис. 1-4).

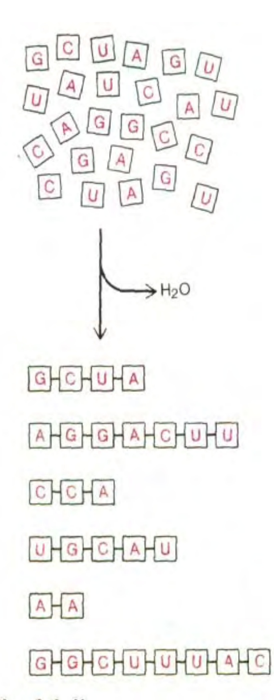


Рис. 1-3. Четыре типа нуклеотидов (показаны буквами, A, U, G, C) могут спонтанно полимеризоваться с высвобождением воды. В результате получается смесь олигонуклеотидов случайной длины и случайной последовательности.

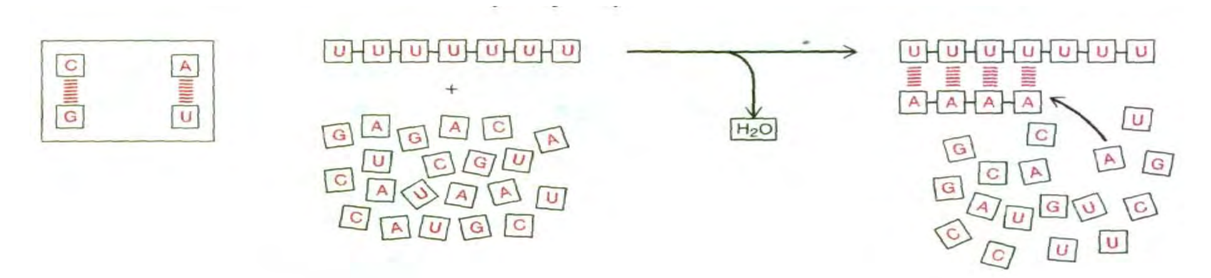


Рис. 1-4. Нуклеотиды способны связываться друг с другом (причем G предпочтительно связывается с C, а A - с U) при помощи сравнительно слабых химических связей *(слева)*. Такое связывание позволяет одному полинуклеотиду служить матрицей для синтеза другого *(справа)*.

Специфическое спаривание комплементарных нуклеотидов сыграло, видимо, решающую роль в возникновении жизни. Рассмотрим, например, полинуклеотид, подобный РНК и содержащий основания урацил (U), аденин (A), цитозин (C) и гуанин (G). Благодаря комплементарному спариванию оснований - A с U и G с C - при добавлении РНК к смеси активированных нуклеотидов в условиях, благоприятствующих полимеризации, синтезируется новая молекула РНК, последовательность нуклеотидов которой комплементарна последовательности нуклеотидов в исходной РНК. Таким образом, новые молекулы представляют собой как бы слепок исходной молекулы, каждому A которой соответствует U в копии и т. д. На первой стадии информация, содержащаяся в последовательности исходной цепи РНК, сохраняется в новообразующихся комплементарных цепях. На второй стадии копирование с использованием комплементарной цепи в качестве матрицы восстанавливает исходную последовательность (рис. 1-5).

Механизмы *комплементарного матричного копирования* изящны и просты, они занимают центральное место в процессах переноса информации в биологических системах. Генетическая информация каждой клетки закодирована в последовательности оснований ее полинуклеотидов, и эта информация передается из поколения в поколение благодаря комплементарному спариванию оснований.

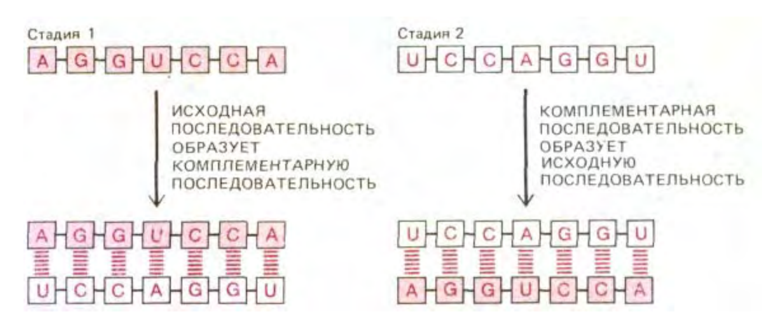


Рис. 1-5. Репликация последовательности полинуклеотида (здесь молекулы РНК). На стадии 1 исходная молекула РНК служит матрицей для образования молекулы РНК с комплементарной последовательностью. На стадии 2 эта комплементарная молекула в свою очередь служит матрицей для образования молекулы РНК с исходной последовательностью. Поскольку каждая матрица способна произвести много комплементарных копий, эти реакции могут привести к «размножению» исходной последовательности.

Для быстрого образования полинуклеотидов в пробирке обязательно должны присутствовать специфические белковые катализаторы-ферменты, которых не могло быть в «пребиотическом бульоне». Там, однако, были, очевидно, минералы и ионы металлов, способные служить менее эффективными катализаторами. Кроме того, катализаторы лишь ускоряют реакции, которые происходили бы и без них, но за достаточно долгое время. Поскольку и время, и химически активные предшественники нуклеотидов имелись в изобилии, то вполне возможно, что в пребиотических условиях на Земле стало возможным возникновение медленно реплицирующихся систем полинуклеотидов.

1.1.3. Самореплицирующиеся молекулы подвержены естественному отбору

При любом процессе копирования неизбежно происходят ошибки и размножаются неточные копии оригинала. Следовательно, в результате многократных циклов репликации образующаяся последовательность нуклеотидов будет существенно отличаться от исходной. Так формируется разнообразие молекул. В случае РНК эти молекулы, вероятно, будут иметь и разные функциональные свойства. Ведь молекулы РНК - это не просто цепочка символов, неким абстрактным образом несущая информацию. Они обладают химической индивидуальностью, влияющей на их поведение. Конкретная последовательность нуклеотидов определяет свойства молекулы, особенно характер ее свертывания (кон-формацию) в растворе. Мономеры полинуклеотида могут не только спариваться со свободными комплементарными нуклеотидами среды с образованием нового полимера, но и образовывать пары с комплементарными нуклеотидными остатками того же самого полимера. Последовательность GGGG в одной части полинуклеотидной цепи может сравнительно прочно связаться с СССС из другого участка молекулы. Из-за подобных взаимодействий возникают различные трехмерные изгибы, и молекула в целом приобретает уникальную форму, полностью определяемую ее нуклеотидной последовательностью (рис. 1-6).

Трехмерная укладка полинуклеотида влияет на его стабильность и на способность реплицироваться, так что не все молекулы в репликативной смеси будут одинаково успешно размножаться. В лабораторных опытах было показано, что система реплицирующихся молекул РНК подвержена своего рода естественному отбору, при котором в зависимости от конкретных условий начнет преобладать та или иная последовательность.

Таким образом, молекула РНК обладает двумя важными свойствами: закодированная в ее нуклеотидной последовательности информация передается в процессе репликации, а уникальная пространственная структура определяет характер взаимодействия с другими молекулами и реакцию на внешние условия. Оба этих свойства – информационное

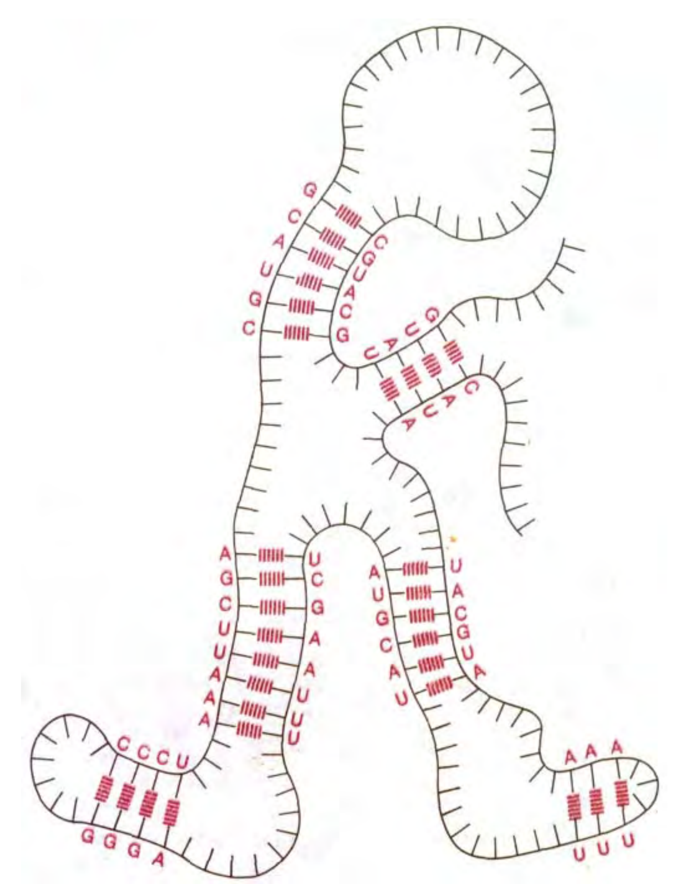


Рис. 1-6. В результате спаривания нуклеотидов из разных участков одной и той же полинуклеотидной цепи (РНК) молекула принимает определенную форму.

и функциональное - являются необходимыми предпосылками эволюционного процесса. Нуклеотидная последовательность молекулы РНК аналогична наследственной информации, или *генотипу* организма. Пространственная укладка аналогична *фенотипу* - совокупности признаков организма, подверженных действию естественного отбора.

1.1.4. Специализированные молекулы РНК могут катализировать биохимические реакции

Естественный отбор зависит от условий среды. Для реплицирующейся молекулы РНК критическим компонентом среды является набор других молекул РНК в растворе. Кроме того, что эти молекулы служат матрицами при собственной репликации, они могут катализировать разрушение и образование ковалентных связей, в том числе и связей между нуклеотидами. Некоторые специализированные молекулы РНК могут катализировать изменения в других молекулах РНК, разрезая нуклеотидную последовательность в определенной точке, другие типы молекул РНК способны вырезать часть своей собственной нуклеотидной последовательности и соединять отрезанные концы (процесс, называемый *самосплайсингом).* Каждая реакция, катализируемая РНК, зависит от специфического расположения атомов на поверхности каталитической молекулы РНК, которое приводит к тому, что один или несколько ее нуклеотидов становятся высокоактивными.

Можно предположить, что некоторые реакции имели кардинальное значение в первичном бульоне. Рассмотрим, в частности, полимериза-

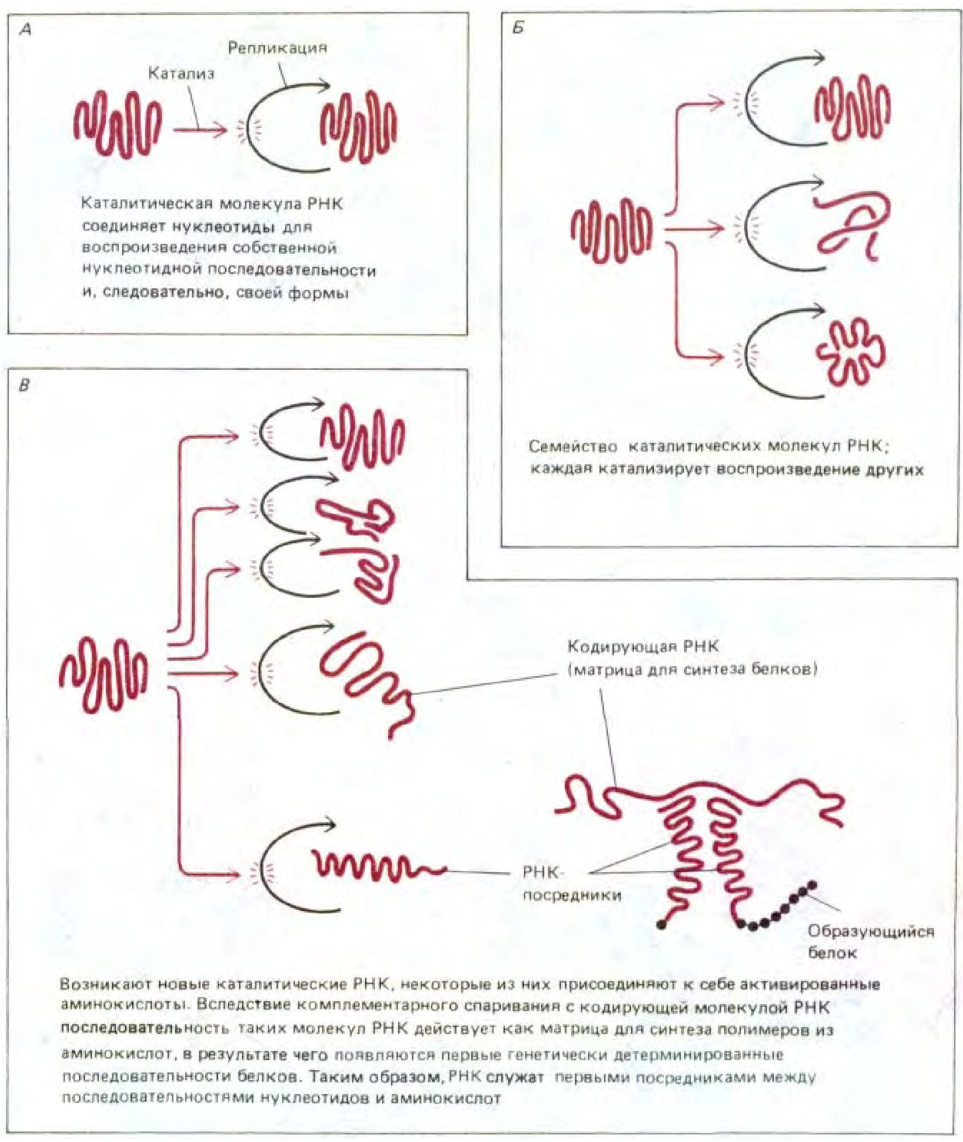


Рис. 1-7. Схема трех последовательных стадий эволюции самореплицирующейся системы молекул РНК, способных направлять синтез белков.

цию РНК, процесс, в котором в качестве матрицы используется данная молекула РНК и который катализируется ею. РНК, действуя на собственные копии, будет реплицироваться с высокой скоростью и эффективностью (рис. 1-7, *А).* Это может способствовать репликации других типов молекул РНК в прилежащих областях. Некоторые из них могут обладать каталитической активностью, которая помогает или препятствует сохранению или репликации РНК другими способами. Если благоприятные воздействия взаимосвязаны, то различные типы молекул РНК, специализированные для разных реакций, сформируют кооперативную систему, которая будет реплицироваться с необычно высокой эффективностью (рис. 1-7, *Б).*

1.1.5. Информация передается от полинуклеотидов к полипептидам

Итак, мы предполагаем, что 3,5-4 млрд. лет назад где-то на Земле самореплицирующиеся системы молекул РНК положили начало эволюционному процессу. Системы с различными наборами последовательностей нуклеотидов конкурировали за запасы предшественников, необ-

ходимых им для построения копий (аналогично тому, как сейчас конкурируют организмы за пищевые ресурсы). Успех зависел от точности и скорости копирования, а также от стабильности копий.

Хотя структура полинуклеотидов хорошо приспособлена для хранения и передачи (репликации) информации, каталитические возможности молекул РНК, по-видимому, слишком ограничены, чтобы обеспечить все функции современной клетки. Большая универсальность присуща полипептидам, они состоят из аминокислот с химически разнообразными боковыми цепочками и способны принимать разные пространственные формы, которые насыщены реакционноспособными участками. Свойства полипептидов делают их идеально подходящими для выполнения широкого круга структурных и функциональных задач. Даже полипептиды со случайной последовательностью, возникавшие под действием пребиотических синтетических механизмов, видимо, имели каталитические свойства и, в частности, могли облегчать репликацию молекул РНК. Полинуклеотиды, способствующие синтезу полезных полипептидов в своем окружении, должны были приобрести большое преимущество в эволюционной борьбе. Но каким образом полинуклеотиды могли бы осуществлять подобный контроль? Как информация, закодированная в их последовательности, может определять последовательность полимеров иного типа? Ясно, что полинуклеотиды должны действовать как катализаторы для сборки отобранных аминокислот. У современных организмов согласованная система молекул РНК направляет синтез полипептидов, т. е. **синтез белка,** однако этот процесс идет при участии других белков, синтезированных заранее. Биохимический аппарат, осуществляющий синтез белка, чрезвычайно сложен. Молекулы РНК одного типа содержат генетическую информацию о последовательности соответствующего полипептида. Роль других молекул РНК заключается в связывании определенной аминокислоты и переносе ее к месту сборки полипептидной цепи. Основой взаимодействия этих двух типов молекул РНК является комплементарность их оснований, что позволяет последовательности нуклеотидов информационной РНК направлять включение определенных аминокислот, доставляемых молекулами транспортной РНК, в растущую полипептидную цепь. Предшественники этих двух типов молекул РНК, по-видимому, направляли первый синтез белка без помощи белков (рис. 1-7, *В).*

Сегодня сборка новых белков в клетке происходит на поверхности *рибосом* - сложных частиц, состоящих из нескольких больших молекул РНК (но уже другого класса) и более чем из 50 различных типов белков. В гл. 5 мы покажем, что рибосомной РНК принадлежит роль главного катализатора в процессе синтеза белка, она составляет более 60% массы рибосомы. По крайней мере в эволюционном аспекте эта РНК представляет собой основной компонент рибосомы.

Итак, на сегодняшний день представляется весьма вероятным, что РНК примитивным образом направляла первичный синтез белков. Для более эффективного биосинтеза клетке необходимо было создать набор «инструментов» (в форме белков), часть которых могла быть использована при репликации РНК и в процессе синтеза этих белковых «инструментов».

Синтез специфических белков под управлением РНК потребовал «разработки» кода, с помощью которого полинуклеотидная последовательность определяет последовательность аминокислот в белке. Этот *код - генетический* код - записан в «словаре» трехбуквенных слов: различные триплеты нуклеотидов кодируют специфические аминокислоты. Код, по-видимому, был «выбран» произвольно и до сих пор остается фактически одинаковым у всех живых организмов. Это наводит на мысль, что все современные клетки являются потомками одной прими-

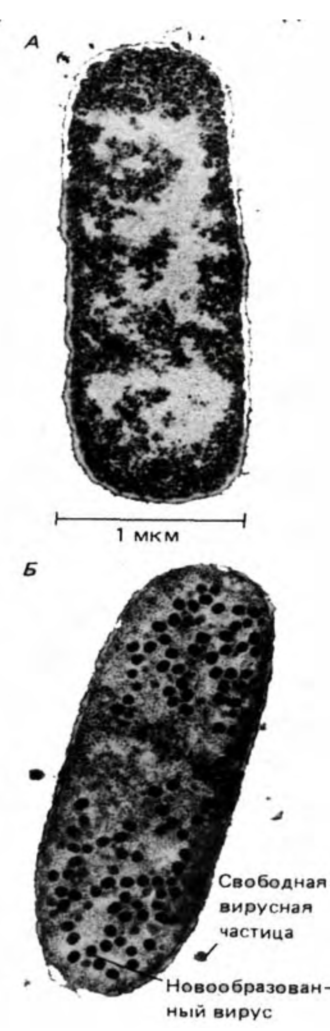


Рис. 1-8. Микрофотография бактериальной клетки *(Escherichia coli)* в нормальном здоровом состоянии (А) и через час после инфицирования бактериофагом Т4 (5). Частицы фага (некоторые из них видны прикрепленными к наружной оболочке клетки) впрыскивают свою ДНК в клетку, затем эта ДНК направляет синтез специфических фаговых белков, одни из которых разрушают ДНК бактерии-хозяина, а другие катализируют репликацию ДНК бактериофага. На представленной стадии вновь синтезированная фаговая ДНК, упакованная в белковые оболочки, видна в виде плотных частиц в цитоплазме. Клетка готова к лизису.

тивной линии клеток, сумевших «разработать» эффективный механизм синтеза белка.

Как только эволюция нуклеиновых кислот продвинулась до кодирования ферментов, обеспечивающих их собственное воспроизведение, распространение репликативной системы должно было резко ускориться. Взрывной характер такого автокаталитического процесса можно видеть на примере жизненного цикла некоторых современных вирусов бактерии: проникнув в бактерию, эти вирусы направляют синтез белков, избирательно катализирующих их собственную репликацию, и в короткое время оккупируют всю клетку (рис. 1-8).

1.1.6. Первая клетка окружает себя мембраной

Одним из решающих событий, приведших к формированию первой клетки, очевидно было формирование внешней мембраны. В самом деле, белки, синтезируемые под контролем определенного типа РНК, не могли бы облегчить репродукцию именно этих молекул РНК, если бы не удерживались поблизости от них. Более того, до тех пор, пока белки свободно диффундировали в популяции реплицирующихся молекул РНК, они в равной степени способствовали размножению любого из конкурирующих видов РНК. Если возникала РНК, производящая улучшенный тип фермента, новый фермент не способен был *избирательно* обеспечить выживание именно этой измененной РНК. Отбор молекул РНК по качеству кодируемых ими белков не мог начаться раньше, чем появился некий замкнутый объем (компартмент), заключивший в себя белки, произведенные молекулой РНК. Таким образом, эти белки становятся доступными только для РНК, порождающей их (рис. 1-9).

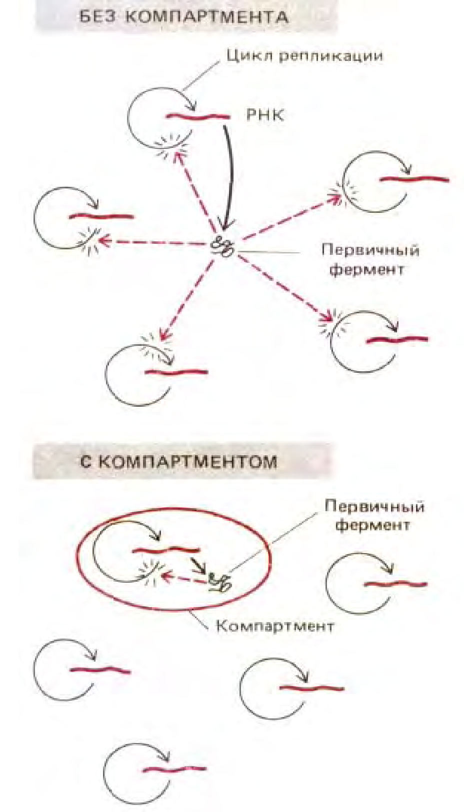


Рис. 1-9. Схема, демонстрирующая эволюционное преимущество компартментации. В смешанной популяции самореплицирующихся молекул РНК, способных направлять синтез белка (как показано на рис. 1-7), любой улучшенный вид РНК, производящий более полезный белок, вынужден делиться плодами этого преимущества со всеми своими конкурентами. Но если РНК заключена в каком-либо компартменте (таком, например, как липидная мембрана), то любой производимый ею белок используется для ее собственных нужд. Таким образом, появляется возможность отбора РНК по качеству производимого ею белка.

Важнейшая роль в эволюции клеточных мембран, по-видимому, принадлежит классу амфипатических молекул, которые обладают простым физико-химическим свойством: одна их часть гидрофобна (нерастворима в воде), а другая - гидрофильна (растворима в воде). Когда такие молекулы попадают в воду, они располагаются так, что их гидрофобные части приходят в тесный контакт друг с другом, а гидрофильные части - в контакт с водой. Амфипатические молекулы способны спонтанно агрегировать, образуя двухслойные структуры в виде маленьких замкнутых пузырьков, изолирующих водное содержимое от внешней среды (рис. 1-10). Этот феномен может быть продемонстрирован в пробирке путем простого смешивания фосфолипидов и воды: при подходящих условиях действительно образуются маленькие пузырьки. Все ныне существующие клетки окружены **плазматической мембраной,** состоящей из амфипатических молекул, главным образом фосфолипидов, такой структуры; в клеточных мембранах в состав липидного бислоя входят также амфипатические белки. В электронном микроскопе такие мембраны имеют вид листков толщиной около 5 нм с выраженной трехмерной структурой (следствие плотной укладки фосфолипидных молекул хвост к хвосту).

Не совсем ясно, в какой момент эволюции биологического катализа были сформированы первые клетки. Они могли появиться, когда молекулы фосфолипидов пребиотического бульона случайно собрались в мембранную структуру, заключившую в себя самореплицирующуюся смесь каталитических молекул РНК. Однако принято считать, что синтез белков осуществлялся до появления клеток. В любом случае, как только они оказались заключенными в замкнутую мембрану, молекулы РНК начали эволюционировать не только на основе их собственной структуры, но также в зависимости от их воздействия на другие молекулы в том же компартменте: нуклеотидные последовательности РНК могли теперь влиять на признаки целой клетки.

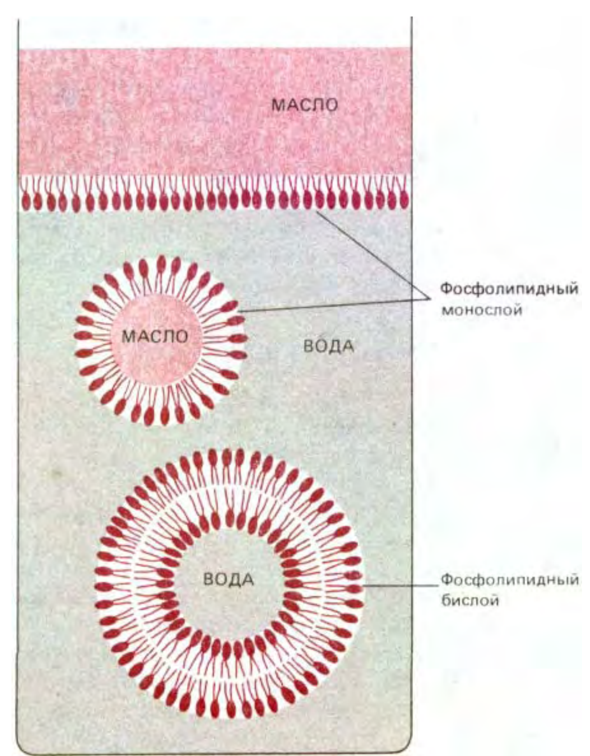


Рис. 1-10. Клеточные мембраны состоят из фосфолипидов. Поскольку эти молекулы имеют гидрофильные «головы» и липофильные (гидрофобные) «хвосты», на поверхности раздела воды и масла они самопроизвольно будут располагаться головными концами к воде, а хвостовыми к маслу. В воде эти молекулы ассоциируют с образованием замкнутых двухслойных пузырьков (везикул), в которых липофильные хвосты контактируют друг с другом, а гидрофильные контактируют с водой.

1.1.7. Все современные клетки используют ДНК в качестве наследственного материала

Нарисованная нами выше картина, конечно, весьма умозрительна. Не существует ископаемых остатков, по которым можно было бы проследить зарождение первой клетки. Тем не менее анализ современных организмов и лабораторные опыты убедительно показывают, что в основных чертах наш эволюционный обзор справедлив. События, обусловившие образование первой клетки (пребиотический синтез малых молекул, саморепликация молекул РНК, трансляция последовательностей РНК в аминокислотные последовательности, возникновение окруженных мембранами компартментов в результате самосборки молекул липидов), очевидно, происходили 3,5-4 млрд. лет назад.

Полезно сравнить нашу гипотетическую первую клетку с простейшими современными клетками, **микоплазмами.** Микоплазмы это похожие на бактерий мелкие организмы, обычно ведущие паразитический образ жизни, тесно связанный с какими-либо клетками растений или животных (рис. 1-11). Они имеют в диаметре около 0,3 мкм и содержат нуклеиновую кислоту в количестве, достаточном для кодирования приблизительно 750 различных белков. Некоторые из этих белков являются ферментами, другие выполняют структурные функции, часть белков находится внутри клетки, но есть и встроенные в ее мембрану. Все вместе они синтезируют те из нужных клетке малых молекул, которых нет в окружающей среде, перераспределяют энергию, необходимую для протекания биосинтетических реакций, и поддерживают в клетке необходимые химические условия.

Первые клетки на Земле, по-видимому, содержали значительно меньше компонентов, чем микоплазмы, и делились значительно медленнее. Однако существует и более существенное различие между прими-



Рис. 1-11. *Spiroplasma citrii* микоплазма, размножающаяся в растительных клетках.

тивными клетками и микоплазмами (и, разумеется, любыми другими современными клетками): генетическая информация в существующих ныне клетках хранится в ДНК, а не в РНК, что было присуще примитивным клеткам. В современных клетках есть оба типа полинуклеотидов, но в ходе эволюции они специализировались и работают сообща, выполняя каждый свою функцию. Небольшие химические различия между этими двумя типами молекул делают их приспособленными для решения разных задач. Например, ДНК используется в качестве хранилища генетической информации, поскольку ее молекула более стабильна, чем молекула РНК. Частично это обусловлено тем, что у ДНК отсутствует гидроксильная группа сахара, и поэтому РНК в большей степени подвержена гидролизу. Кроме того, ДНК в отличие от РНК существует преимущественно в виде двухцепочечных молекул, состоящих из двух комплементарных полинуклеотидных цепей, Такая двухцепочечная структура позволяет ДНК относительно легко реплицироваться (что будет изложено в гл. 3) и репарировать повреждения: при этом неповрежденная цепь ДНК служит матрицей для восстановления комплементарной дефектной цепи. Используя все тот же принцип комплементарности, ДНК направляет синтез отдельных молекул РНК, однако в этом случае спаривание происходит между несколько различающимися типами нуклеотидов. Синтезированные таким образом одноцепочечные молекулы РНК выполняют две другие функции первобытных полинуклеотидов: они направляют синтез белков и как кодирующие молекулы (информационные РНК), и как каталитические молекулы (рибосомные и другие неинформационные РНК).

Существующие на сегодняшний день представления об эволюции первобытных молекул можно суммировать так. Генетические и каталитические свойства РНК позволяют предположить, что именно эти молекулы первыми включились в эволюцию. После возникновения эффективного синтеза белка ДНК приняла на себя генетическую функцию, белки стали основными катализаторами, а РНК сохранилась главным образом как промежуточное звено между ними (рис. 1-12). ДНК стала необходимой только тогда, когда клетки сильно усложнились и для них потребовалось значительно больше генетической информации, чем та, которую могли стабильно поддерживать молекулы РНК.

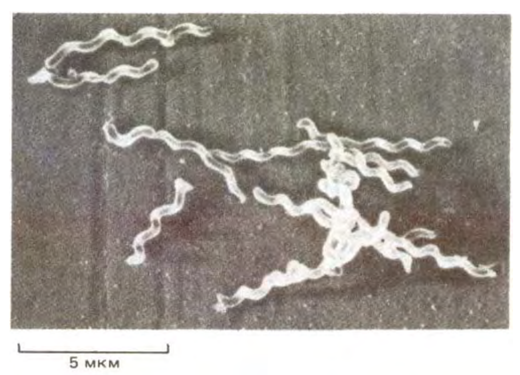


Рис. 1-12. Предполагаемые стадии эволюции от простых самореплицирующихся систем молекул РНК до современных клеток, у которых ДНК является хранилищем генетической информации, а РНК выполняет роль посредника в осуществлении белкового синтеза.

Заключение

Живые клетки скорее всего появились на Земле приблизительно 3,5 млрд, лет назад в результате спонтанной агрегации молекул. Изучение совре-

менных организмов и содержащихся в них молекул позволяет предполагать, что развитие автокаталитических механизмов, присущих живым системам, началось с эволюции группы молекул РНК, которые могли катализировать собственную репликацию. Со временем одна из этих групп согласованно катализирующих РНК приобрела способность к прямому синтезу полипептидов. Первые клетки, по-видимому, широко использовали каталитические функции и РНК, и белков, а в качестве вещества наследственности содержали только РНК. После того как накопление дополнительных каталитических белков сделало возможным развитие более эффективных и сложных клеток, двухцепочечная ДНК заменила РНК в роли хранителя генетической информации.

1.2. От прокариот - к эукариотам [6]

Существует предположение, что все ныне живущие организмы произошли из единственной, возникшей несколько миллиардов лет назад первобытной клетки. Пережив своих конкурентов, эта клетка положила начало процессу клеточного деления и эволюции, который в конце концов создал зеленый покров Земли, изменил состав ее атмосферы и сделал ее родиной разумной жизни. Видимо, только так можно объяснить «фамильное сходство» между всеми организмами. На эволюционном пути имеется важная веха. Приблизительно 1,5 млрд. лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых **прокариот,** к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным **эукариотическим** клеткам, подобным клеткам высших животных и растений.

1.2.1. Прокариотические клетки имеют простую структуру, но различаются по биохимическим свойствам [7]

Бактерии - наиболее простые организмы, обнаруженные в большинстве природных сред обитания. Это - сферические или удлиненные клетки обычно размером в несколько микрометров (рис. 1-13). Как правило, у них имеется жесткая защитная оболочка, называемая *клеточной стенкой,* под которой находится плазматическая мембрана, ограничивающая единственный цитоплазматический компартмент, содержащий ДНК, РНК, белки и малые молекулы. В электронном микроскопе содержимое таких клеток имеет вид матрикса различной плотности без явно выраженных организованных внутренних структур (см. рис. 1-8, *А).*

Бактерии малы и способны быстро размножаться путем простого бинарного деления. При избытке питательных веществ «выживание наиболее приспособленных» обычно означает выживание тех, которые быстрее всех делятся. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 минут и, таким образом, образовать до 5 млрд. клеток (что приблизительно равно населению земного шара) менее, чем за 11 часов. Благодаря способности быстро делиться бактериальные популяции с легкостью адаптируются к изменениям окружающей среды. Например, в лабораторных условиях популяция бактерий, поддерживаемая в большом сосуде, за несколько недель благодаря спонтанным мутациям и естественному отбору приобретает способность использовать в качестве источника углерода новые типы Сахаров.

В природе бактерии занимают невообразимое множество экологических ниш, и столь же многообразным оказывается их биохимическое строение. Различают две группы бактерий: *эубактерии* - часто встречающиеся формы, населяющие почву, воду и другие организмы, и *архе-*

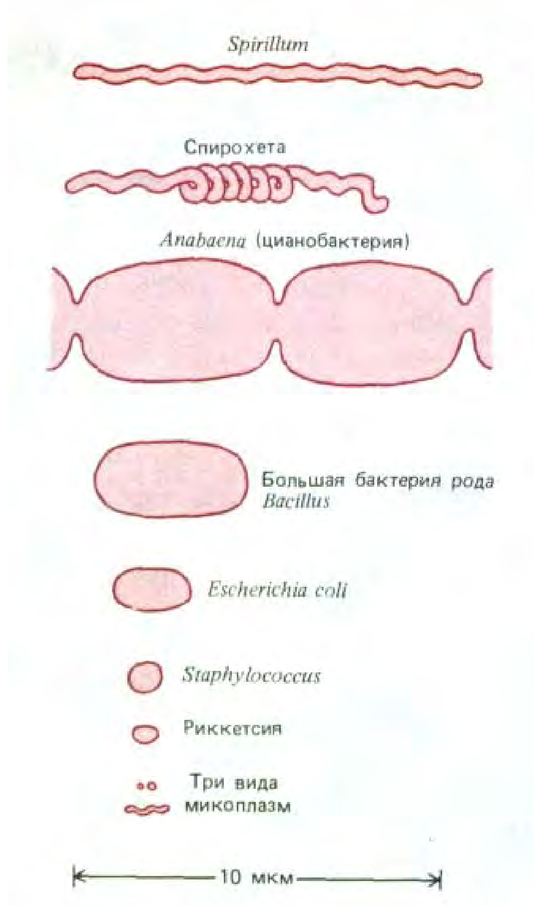


Рис. 1-13. Некоторые прокариотические клетки, изображенные в одинаковом масштабе.

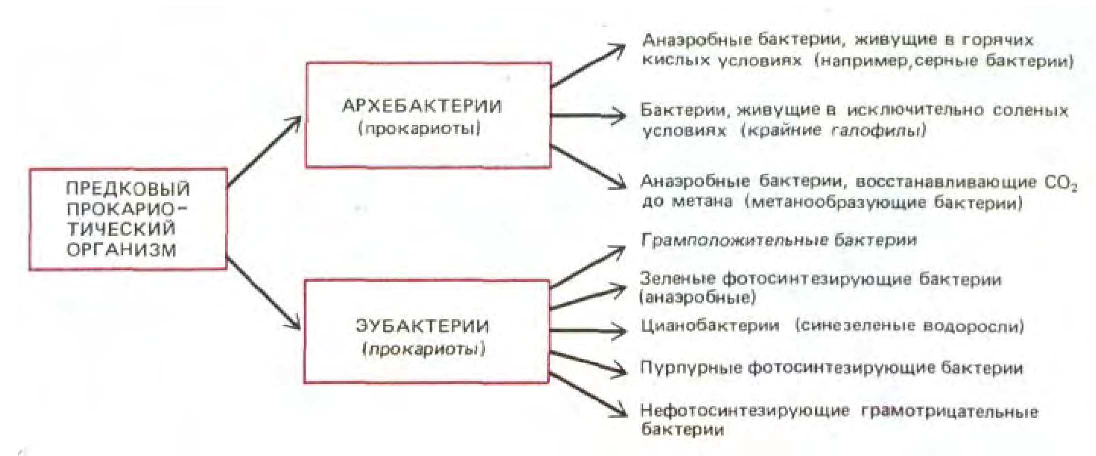


Рис. 1-14. Родственные связи между современными бактериями (стрелками показаны вероятные пути эволюции). Происхождение эукариотических клеток обсуждается дальше в тексте.

бактерии, встречающиеся в таких неудобных средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники (рис. 1-14).

Существуют виды бактерий, способные питаться практически любыми органическими молекулами - сахарами, аминокислотами, жирами, углеводами, полипептидами и полисахаридами. Некоторые даже могут получать атомы углерода из CO_2 и атомы азота из N_2. Несмотря на относительно простое строение, бактерии живут на Земле дольше любых других организмов и превосходят по численности все другие типы клеток.

1.2.2. Развитие метаболических реакций

Бактерии, которая растет в растворе солей, содержащем в качестве единственного источника углерода глюкозу, необходимо осуществлять множество химических реакций. Она должна не только извлечь из глюкозы химическую энергию, необходимую для многих жизненно важных процессов, но и использовать атомы углерода для синтеза всех необходимых клетке органических молекул. Эти реакции катализируются сотнями ферментов, последовательно работающих в «цепях» химических реакций, так что продукт одной реакции служит субстратом для следующей. Такие цепи ферментативных реакций, называемые *метаболическими путями,* обсуждаются в следующей главе.

Вначале, когда жизнь на Земле только зародилась, в метаболических реакциях, видимо, не было необходимости: клетки могли жить и расти, питаясь окружающими их молекулами - наследием первобытного бульона. По мере истощения этих естественных ресурсов большое преимущество при отборе должны были получить организмы, вырабатывающие ферменты для образования органических молекул. Считается, что таким образом наличный комплект клеточных ферментов постепенно увеличивался, и в результате возникли метаболические пути современных организмов. Два возможных варианта эволюции метаболических путей проиллюстрированы на рис. 1-15.

Если эволюция метаболических путей шла путем последовательного добавления новых ферментативных реакций к существовавшим ранее, то, подобно самым старым годовым кольцам на срезе ствола, наиболее древние реакции должны находиться ближе всего к центру «метаболического древа» - там, где синтезируются наиболее существенные молекулярные «кирпичики». Такое центральное положение в метаболизме прочно занимают реакции с участием фосфатов Сахаров, в самом центре которых, видимо, находится последовательность реакций, называемая **гликолизом** и способная осуществлять расщепление глюкозы в отсутствие кислорода (т. е. *анаэробно).* Самые древние из метаболических путей

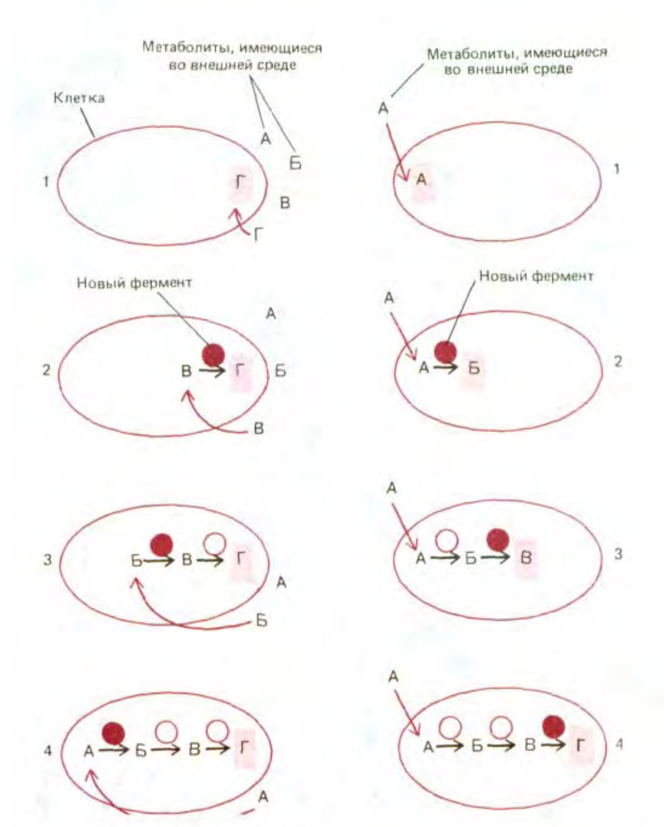


Рис. 1-15. Схема, иллюстрирующая два возможных механизма возникновения метаболических путей. Клетка слева имеет в своем распоряжении запасы родственных соединений (А, Б, В, *Г),* возникшие благодаря пребиотическому синтезу. Одно из соединений (Г) метаболически полезно. По мере истощения запасов этого соединения преимущество при отборе получают те клетки, которые «учатся» синтезировать новый фермент, катализирующий образование Г из В. Последовательное повторение подобных этапов могло бы привести к развитию важных метаболических путей. В клетке, показанной справа, в изобилии имеется метаболически полезное соединение А. В процессе эволюции возникает фермент, который случайно оказывается способным превращать соединение А в соединение Б. Затем клетка претерпевает другие изменения, позволяющие ей использовать это новое вещество. Дальнейшее появление новых ферментов может в конце концов привести к возникновению длинной цепи реакций.

должны были быть анаэробными, поскольку в атмосфере первобытной Земли кислорода не было. Практически во всех живых клетках протекают реакции гликолиза, сопровождающиеся образованием *аденозинтрифосфата,* или АТР, - соединения, используемого всеми клетками в качестве источника легкодоступной химической энергии.

С находящимися в центре обмена веществ превращениями фосфатов Сахаров связаны сотни других химических реакций. Часть из них отвечает за синтез малых молекул, многие из которых в свою очередь используются в дальнейших реакциях синтеза больших, специфических для конкретного организма полимеров. Другие реакции участвуют в расщеплении сложных молекул пищи до более простых химических соединений. Одна из наиболее поразительных особенностей всех этих

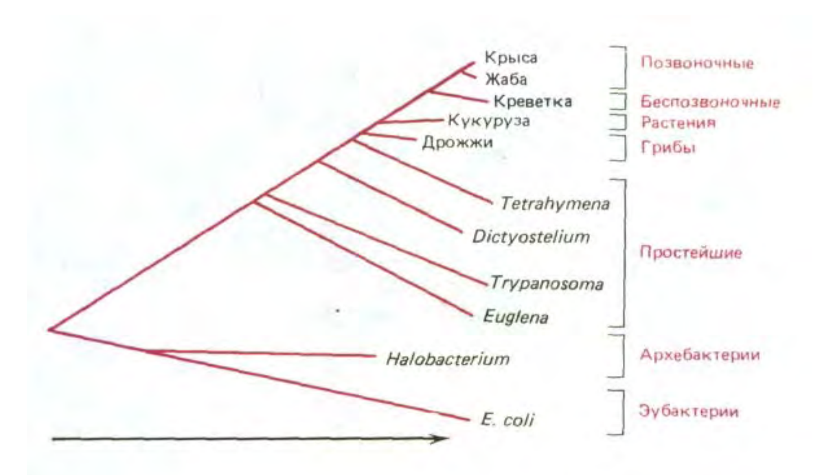


Рис. 1-16. Эволюционное родство организмов по данным секвенирования (определения нуклеотидных последовательностей) генов рибосомной РНК малой субъединицы. Эти гены содержат высококонсервативные последовательности, меняющиеся столь медленно, что их можно использовать для «измерения» филогенетического родства между представителями всех групп живых организмов. Из этих данных следует, что в ходе эволюции эукариотических клеток линии растений, животных и грибов дивергировали от общего предка сравнительно поздно. (По М. L. Sogin, H.J. Elwood, J. H. Gunderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1383-1387, 1986.)

реакций - это то, что они протекают в любых типах организмов. Конечно, существуют и отличия: многие специфические продукты метаболизма присущи только некоторым родам или видам. Например, общая для всех аминокислота лизин синтезируется различными путями у бактерий, дрожжей и зеленых растений, и совсем не синтезируется у высших животных. Тем не менее в широком смысле подавляющее большинство реакций и катализирующих их ферментов характерно для всех живых существ - от бактерий до человека. Поэтому считается, что примитивные исходные клетки, породившие все живое, уже выполняли эти реакции. Ферменты, катализирующие основные метаболические реакции, по мере дивергенции организмов постепенно модифицировались, не изменяя при этом своей основной функции. Поэтому аминокислотные последовательности одного и того же типа фермента в различных современных организмах, содержат исключительно ценную информацию об эволюционном родстве этих видов. Полученные таким путем данные хорошо согласуются с результатами других исследований, например с изучением ископаемых остатков. Еще более богатый источник информации заключен в нуклеотидных последовательностях ДНК современных клеток. Сравнение высококонсервативных последовательностей, которые детерминируют основные функции (и, следовательно, очень медленно меняются в ходе эволюции), позволяет судить о родстве давно дивергировавших организмов (рис. 1-16). Более быстро эволюционировавшие последовательности могут использоваться для оценки эволюционных процессов у родственных видов (рис. 1-17). Можно надеяться, что применение этих методов позволит с беспрецедентной точностью проследить ход эволюционного процесса.



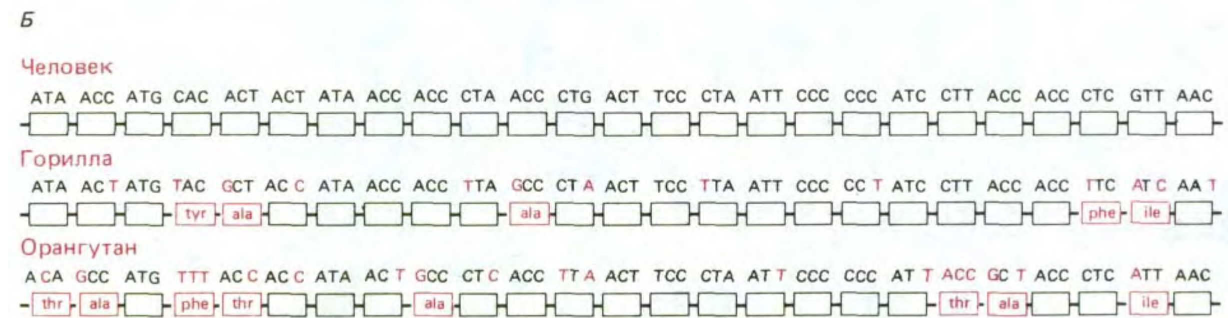


Рис. 1-17. К кому ближе человек, к горилле или орангутану? Ответ на этот вопрос можно получить, проанализировав последовательности ДНК этих видов и построив родословную, представленную в верхней части рисунка. Для выяснения филогенетического родства между близкородственными организмами обычно используют митохондриальную ДНК, поскольку она эволюционирует примерно в 5-10 раз быстрее, чем ядерная ДНК. В нижней части рисунка приведена последовательность первых 75 нуклеотидов одного и того же гена (митохондриальный ген, кодирующий субъединицу NAD-дегидрогеназы) для каждого из видов. Цветными буквами отмечены участки, по которым горилла и орангутан отличаются от человека. Прямоугольники под нуклеотидными последовательностями обозначают аминокислоты в соответствующих белках. Названия аминокислот, если они отличаются от соответствующих аминокислот человека, также выделены цветом. Проведенный анализ показывает, что последовательность гориллы отличается от последовательности человека на 10%, а орангутана - на 17%. Предполагая, что эти различия обусловлены случайными мутациями, появляющимися с одинаковой частотой в линии каждого вида, можно вывести родословную, показанную на схеме А. (Данные из W. M. Brown, E. M. Prager, A. Wang, A. C. Wilson, J. Mol. Biol., 18; 225-239, 1982.)

1.2.3 Цианобактерии способны фиксировать CO_2 и N_2

Самые ранние стадии метаболизма появились в ходе эволюции для того, чтобы восполнить недостачу органических молекул, образовавшихся еще в пребиотических условиях. Что же произошло, когда запас подобных соединений полностью истощился? В этих условиях значительное преимущество при отборе должны были приобрести организмы, способные использовать атомы углерода и азота (в виде CO_2 и N_2) из атмосферы. Но углекислый газ и молекулярный азот хотя и имеются в изобилии, очень стабильны. Их превращение в доступную для усвоения форму (органических молекул, таких, как простые сахара) требует большого количества энергии и значительного числа сложных химических реакций.

Для использования CO_2 в ходе эволюции возник механизм **фотосинтеза,** в процессе которого CO_2 превращается в органическое соединение за счет энергии солнечного излучения. Взаимодействие солнечного света с пигментной молекулой - *хлорофиллом* - переводит электрон в более высокое энергетическое состояние. Энергия, высвобождаемая при обратном переходе электрона на более низкий энергетический уровень, направляется молекулами белка на проведение химических реакций.

По всей вероятности, одной из первых реакций с использованием солнечного света было фосфорилирование нуклеотидов с образованием АТР - богатого энергией соединения. Другой важный этап в ходе эволюции - создание «восстановительной силы» (восстановительных эквивалентов). Дело в том, что атомы азота и углерода в CO_2 и N_2 атмосферы находятся в инертном окисленном состоянии, и один из путей сделать их более реакционноспособными, с тем чтобы они могли участвовать в биосинтезе, - это восстановить их, т.е. передать им электроны. Восстановление идет следующим образом. Хлорофилл, используя энергию солнечного света, отбирает электроны у слабых доноров электронов и переносит их на сильные доноры электронов, которые в свою очередь используются для восстановления CO_2 и N_2. Анализ механизмов фотосинтеза у современных бактерий позволяет сделать вывод о том, что одним из первых источников электронов был H_2S, конечным продуктом обмена (метаболическим отходом) которого должна была быть элементарная сера. Значительно позже развился куда более сложный, но, как оказалось, более полезный процесс «извлечения» электронов из H_2O. В результате в качестве отхода в земной атмосфере начал накапливаться кислород.

В современном мире основной путь, по которому углерод и азот включаются в органические молекулы и поступают в *биосферу,* реализуется в процессе жизнедеятельности цианобактерий (называемых также синезелеными водорослями). К этой группе относятся наиболее автономные из ныне живущих организмов. Они способны «фиксировать» CO_2 и N_2 и существовать только за счет воды, воздуха и солнечного света, причем механизмы, с помощью которых это достигается, в своих общих чертах, по-видимому, не изменились более чем за 1 млрд. лет. Вместе с другими бактериями, обладающими некоторыми из этих способностей, цианобактерий создали условия, в которых могли развиваться более сложные типы организмов: как только одна группа организмов преуспела в синтезе всего диапазона органических компонентов клетки из неорганических веществ, другие организмы получили возможность существовать, питаясь первичными продуцентами и продуктами их жизнедеятельности.

1.2.4. Бактерии могут осуществлять аэробное окисление молекул пищи

Многие сегодня справедливо обеспокоены влиянием человеческой деятельности на окружающую среду. Однако в прошлом другие организмы, хотя и значительно медленнее, тоже вызывали радикальные изменения условий на Земле. Лучше всего это видно на примере состава земной атмосферы, которая с появлением фотосинтеза превратилась из практически лишенной молекулярного кислорода смеси газов в смесь, в которой содержание кислорода составляет 21%.

Учитывая высокую химическую активность кислорода и его способность реагировать с большинством компонентов цитоплазмы, можно сделать вывод, что для многих ранних организмов кислород, видимо, был токсичен (как и для многих современных анаэробных бактерий). Однако именно благодаря высокой реакционной способности кислород способен выступать в роли «поставщика» химической энергии, и не удивительно, что в ходе эволюции организмы использовали это свойство. С помощью кислорода живые существа способны более полно окислять молекулы пищи. Например, в отсутствие кислорода глюкоза может быть расщеплена только до молочной кислоты или этилового спирта, конечных продуктов анаэробного гликолиза. В присутствии же кислорода глюкоза полностью расщепляется до H_2O и CO_2. Таким способом можно получить значительно больше энергии из каждого грамма глюкозы. Энергия, высвобождаемая при аэробном окислении молекул пищи, называемом обычно **дыханием,** используется для синтеза АТР, подобно тому как у фотосинтезирующих организмов АТР образуется за счет солнечной энергии. В обоих случаях происходит ряд последовательных реакций переноса электронов, которые создают разность концентраций ионов H^+ внутри и снаружи небольших ограниченных мембранами компартментов. Полученный таким образом градиент концентрации H^+ служит источником энергии для синтеза АТР. На сегодняшний день дыхание характерно для подавляющего большинства организмов, включая и большинство прокариот.

1.2.5. Клетки эукариот содержат несколько характерных органелл

Как же повлияло накопление молекулярного кислорода в атмосфере на анаэробные организмы, положившие начало жизни на Земле? В мире, богатом кислородом, который не мог быть ими использован, такие организмы оказались в невыгодных условиях. Некоторые из них, без сомнения, вымерли. Другие либо развили способность к дыханию, либо нашли экологические ниши, практически лишенные кислорода, и продолжили в них анаэробное существование. По всей вероятности, существовал и третий класс организмов, который выбрал значительно более хитрую и неизмеримо более богатую отдаленными последствиями стратегию выживания. Считается, что организмы этого класса вступили в *симбиоз* с аэробными клетками, а затем образовали с ними прочную ассоциацию. Это - наиболее привлекательное объяснение возникновения современных клеток **эукариотического** типа (схема 1-1), о которых в основном и пойдет речь в книге.

Эукариотические клетки по определению и в отличие от прокариотических имеют *ядро* (по гречески «карион»). Ядро, в котором находится большая часть клеточной ДНК, ограничено двойной мембраной (рис. 1-18). Таким образом, компартмент, содержащий ДНК, отделен от остального содержимого клетки - **цитоплазмы,** где протекает большинство метаболических реакций. В самой цитоплазме различают множество характерных *органелл.* Среди них особенно выделяются два *типа-ми-*

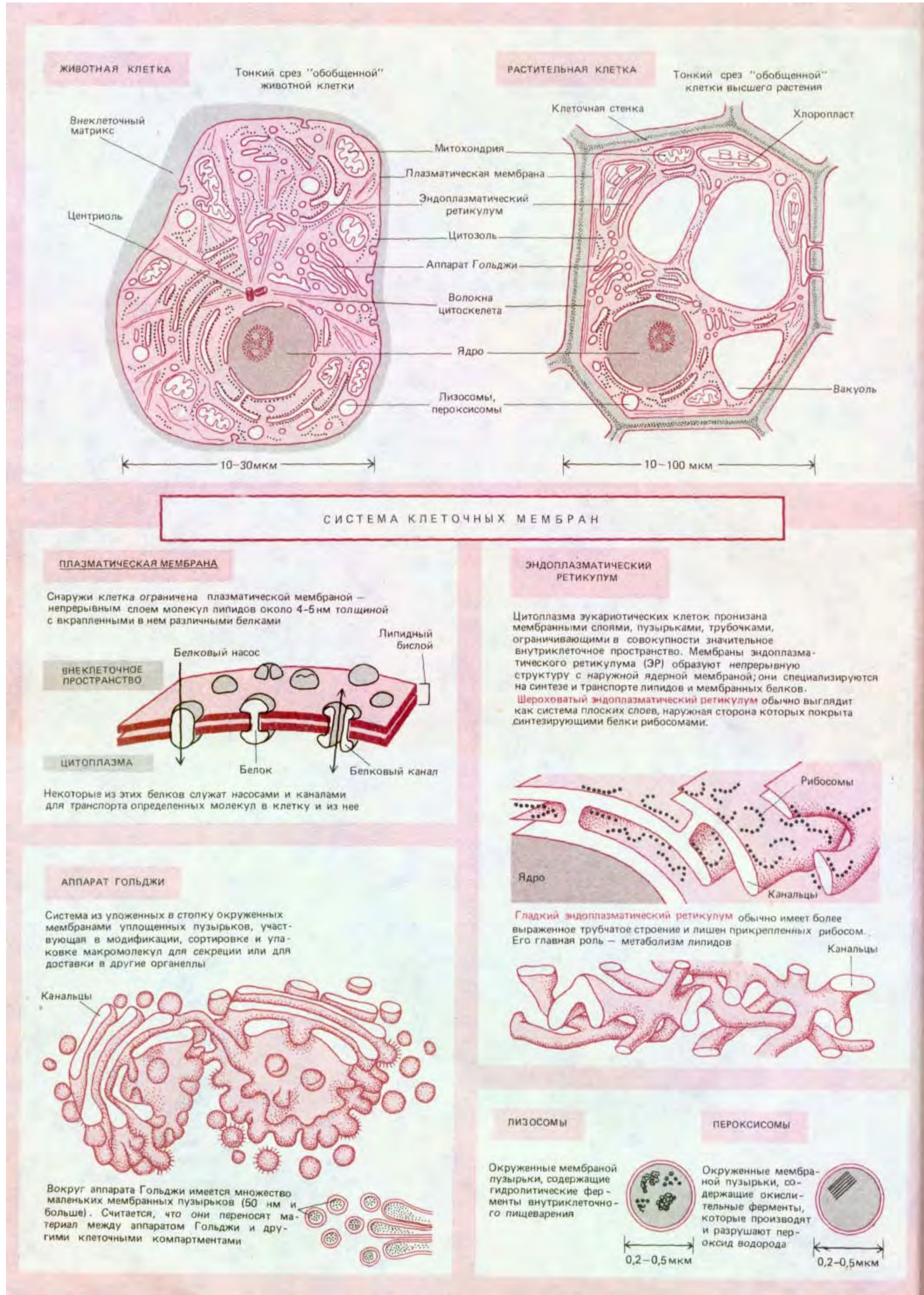
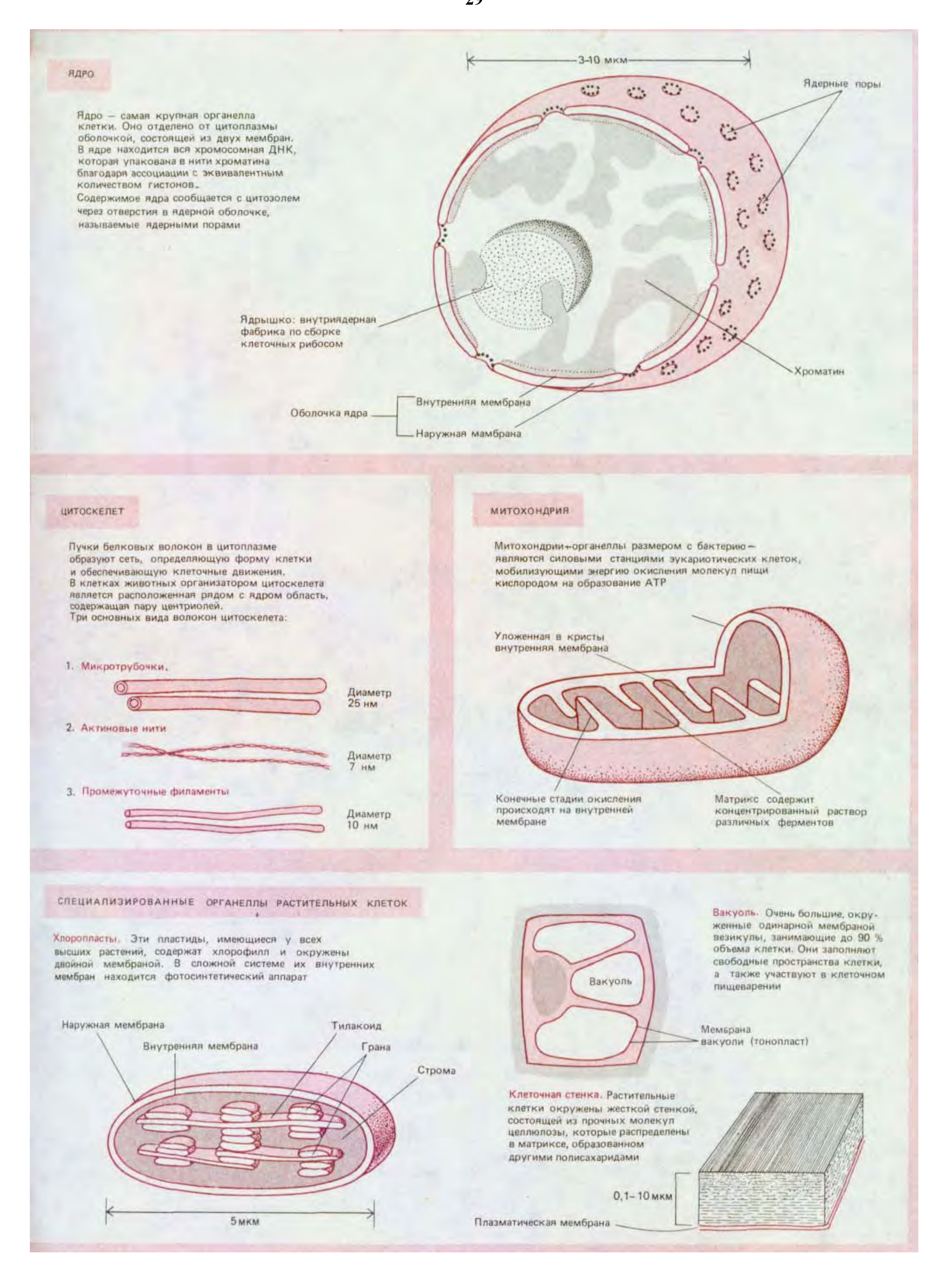


Схема 1-1. Основные органеллы эукариотических клеток.


ЯДРО
Ядро — самая крупная органелла клетки. Оно отделено от цитоплазмы оболочкой, состоящей из двух мембран. В ядре находится вся хромосомная ДНК, которая упакована в нити хроматина благодаря ассоциации с эквивалентным количеством гистонов.
Содержимое ядра сообщается с цитозолем через отверстия в ядерной оболочке, называемые ядерными порами
3-10 мкм
Ядерные поры
Ядрышко: внутриядерная фабрика по сборке клеточных рибосом
Хроматин
Оболочка ядра
Внутренняя мембрана
Наружная мамбрана
ЦИТОСКЕЛЕТ
Пучки белковых волокон в цитоплазме образуют сеть, определяющую форму клетки и обеспечивающую клеточные движения. В клетках животных организатором цитоскелета является расположенная рядом с ядром область, содержащая пару центриолей.
Три основных вида волокон цитоскелета:
1. Микротрубочки.
Диаметр 25 нм
2. Актиновые нити
Диаметр 7 нм
3. Промежуточные филаменты
Диаметр 10 нм
МИТОХОНДРИЯ
Митохондрии – органеллы размером с бактерию – являются силовыми станциями эукариотических клеток, мобилизующими энергию окисления молекул пищи кислородом на образование ATP
Уложенная в кристы внутренняя мембрана
Конечные стадии окисления происходят на внутренней мембране
Матрикс содержит концентрированный раствор различных ферментов
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
Хлоропласты. Эти пластиды, имеющиеся у всех высших растений, содержат хлорофилл и окружены двойной мембраной. В сложной системе их внутренних мембран находится фотосинтетический аппарат
Наружная мембрана
Внутренняя мембрана
Тилакоид
Грана
Строма
5 мкм
Вакуоль
Вакуоль. Очень большие, окруженные одинарной мембраной везикулы, занимающие до 90 % объема клетки. Они заполняют свободные пространства клетки, а также участвуют в клеточном пищеварении
Мембрана вакуоли (тонопласт)
Клеточная стенка. Растительные клетки окружены жесткой стенкой, состоящей из прочных молекул целлюлозы, которые распределены в матриксе, образованном другими полисахаридами
0,1–10 мкм
Плазматическая мембрана

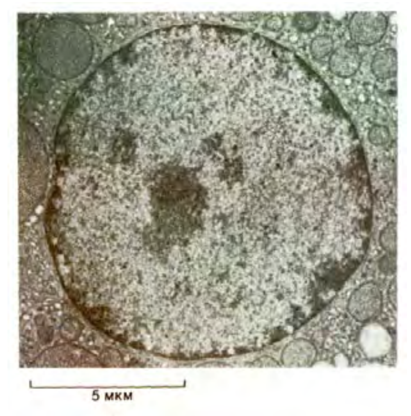


Рис. 1-18. В ядре содержится большая часть ДНК эукариотической клетки. Ядро отчетливо видно на электронной микрофотографии тонкого среза клетки млекопитающего. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)



Рис. 1-19. Электронная микрофотография хлоропласта клетки мха. Видна разветвленная система внутренних мембран. Уплощенные мембранные мешочки, содержащие хлорофилл, организованы в стопки, или граны (Г). Этот хлоропласт содержит также большие скопления крахмала (К). (С любезного разрешения J. Burgess.)



Рис. 1-20. Митохондрии осуществляют окислительное расщепление питательных веществ во всех эукариотических клетках. Как видно на этой электронной микрофотографии, их наружная мембрана гладкая, а внутренняя очень извилистая. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

тохондрии и *хлоропласты* (рис. 1-19 и 1-20). Каждая из этих органелл окружена собственной двойной мембраной, отличающейся по химическим свойствам от мембраны, окружающей ядро. Митохондрии - почти универсальный компонент эукариотических клеток, тогда как хлоропласты встречаются лишь в тех эукариотических клетках, которые способны к фотосинтезу, т. е. в клетках растений, но не животных и грибов. Считается, что обе органеллы имеют симбиотическое происхождение.

1.2.6. Эукариотические клетки зависят от митохондрий, осуществляющих окислительный метаболизм

Митохондрии во многом похожи на свободноживущие прокариотические организмы: например, они напоминают бактерий по форме и размеру, содержат ДНК, производят белок и размножаются делением. Разрушив эукариотические клетки и разделив их компоненты, можно показать, что митохондрии ответственны за дыхание и что ни в каких других частях клетки этот процесс не происходит. Без митохондрий клетки животных

и грибов были бы анаэробами, зависимыми в своих энергетических потребностях от сравнительно малоэффективного и архаичного процесса гликолиза. Многие современные бактерии могут дышать, причем механизм этого дыхания имеет явное сходство с дыханием у митохондрий, и есть все основания думать, что эукариотические клетки являются потомками примитивных анаэробных организмов, которые выжили в богатом кислородом мире, поглотив аэробных бактерий. Они поддерживали их в состоянии симбиоза ради присущей им способности потреблять атмосферный кислород и производить энергию. Анализ некоторых современных организмов свидетельствует о возможности такого эволюционного события. Существует несколько сотен видов одноклеточных эукариот, которые напоминают гипотетический предковый эукариотический организм тем, что живут в условиях дефицита кислорода (например, в кишечнике животных) и совсем не имеют митохондрий. Сравнение нуклеотидных последовательностей, проведенное в последнее время, дает основание предполагать, что одна группа таких организмов, *микроспоридии,* очень рано в эволюции ответвилась от линии, ведущей к другим эукариотическим клеткам. Другой представитель эукариот, амеба *Pelomyxa palustris,* хотя и лишен митохондрий, все же осуществляет окислительный метаболизм, «приютив» в своей цитоплазме аэробных бактерий и установив с ними постоянные симбиотические отношения. Таким образом, существование микроспоридий и *Pelomyxa* свидетельствует о реальности двух этапов в эволюции эукариот, к которым относимся и мы сами.

Приобретение митохондрий должно было иметь много последствий. Например, у прокариотических клеток плазматическая мембрана тесно связана с образованием энергии, в то время как у эукариотических клеток эта важнейшая функция передана митохондриям. Кажется вполне вероятным, что освобождение плазматической мембраны эукариотической клетки от этой функции позволило ей приобрести новые свойства. В частности, поскольку эукариотическим клеткам не нужно поддерживать высокий градиент H^+ на своей мембране (что необходимо для производства АТР у прокариот), у них появляется возможность использовать контролируемые изменения в ионной проницаемости плазматической мембраны в целях клеточной сигнализации. Следовательно, одновременно с возникновением эукариот в плазматической мембране появляются ионные каналы. В настоящее время у высших организмов эти каналы опосредуют сложные процессы передачи электрических сигналов (в частности, в нервной системе), а у одноклеточных свободноживущих эукариот, таких, как простейшие, они во многом определяют их поведение (см. ниже).

1.2.7. Хлоропласты представляют собой потомков «захваченных» прокариотических клеток

Хлоропласты осуществляют фотосинтез в значительной степени так же, как прокариоты-цианобактерии, солнечный свет у них поглощается присоединенным к мембранам хлорофиллом. Некоторые Хлоропласты по строению во многом напоминают цианобактерии, например сходными могут быть их размеры и способ укладки в слои хлорофиллсодержащих мембран (рис. 1-20). Показано также, что хлоропласты размножаются делением, а нуклеотидная последовательность их ДНК почти полностью гомологична определенным участкам бактериальной хромосомы. Все это наводит на мысль, что хлоропласты и цианобактерии имеют общего предка и что хлоропласты произошли от прокариот, «захваченных» когда-то эукариотическими клетками. Прокариоты осуществляли фотосинтез для клеток-хозяев в обмен на предоставляемые



Рис. 1-21. Организм, близкородственный современным цианобактериям, но являющийся облигатным симбионтом другой клетки (вместе эти два организма известны как *Cyanophora paradoxa).* Показан момент деления «цианобактерии». (С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps.)

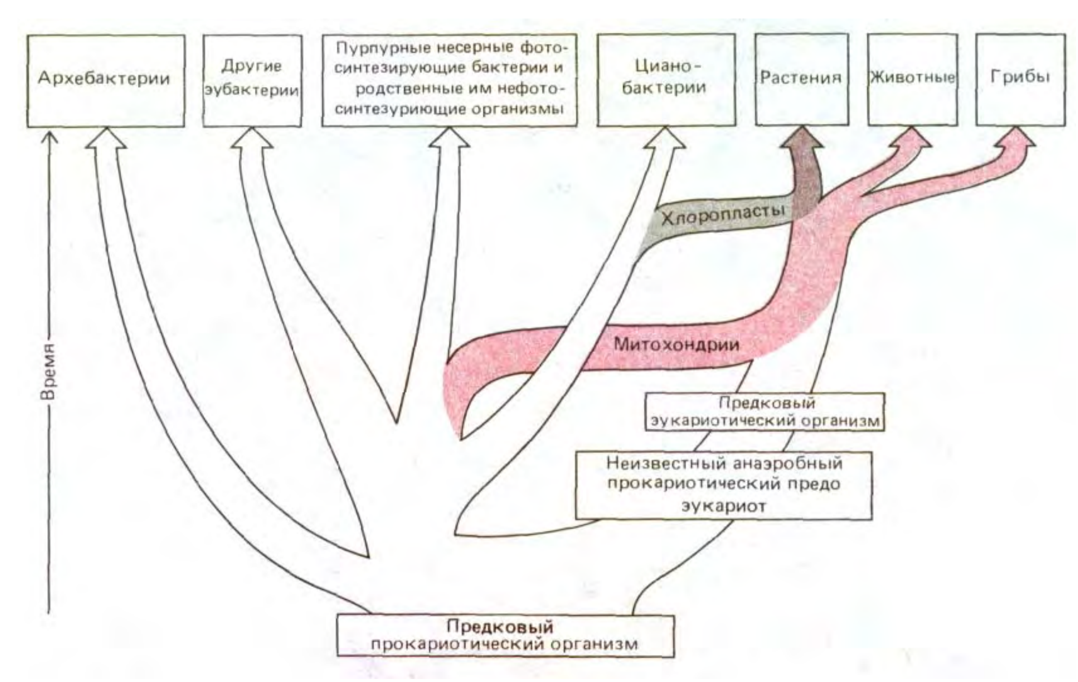


Рис. 1-22. Гипотеза о происхождении эукариот путем симбиоза аэробных и анаэробных прокариот

последними «приют» и питание. Симбиоз фотосинтезирующих клеток с другими типами клеток - явление достаточно частое, и ряд современных эукариотических клеток содержат в себе истинные цианобактерии (рис. 1-21).

Таблица 1-1. Сравнение прокариотических и эукариотических организмов

	Прокариоты	Эукариоты
Организмы	Бактерии и цианобактерии	Протисты, грибы, растения и животные
Размер клеток	Обычный линейный размер 1-10 мкм	Обычный линейный размер 10 100 мкм
Метаболизм	Анаэробный или аэробный	Аэробный
Органеллы	Немногочисленны или отсутствуют	Ядро, митохондрии, хлоропласты, эндоплазматический ретикулум и др.
ДНК	Кольцевая ДНК в цитоплазме	Очень длинная ДНК с большим количеством некодирующих участков организована в хромосомы и окружена ядерной мембраной
РНК и белки	РНК и белки синтезируются в одном компартменте	Синтез и процессинг РНК происходят в ядре, синтез белков в цитоплазме
Цитоплазма	Отсутствие цитоскелета, движения цитоплазмы, эндо- и экзоцитоза	Имеются цитоскелет из белковых волокон, движение цитоплазмы, эндоцитоз и экзоцитоз
Деление клеток	Бинарное деление	Митоз (или мейоз)
Клеточная организация	Преимущественно одноклеточные	Преимущественно многоклеточные с клеточной дифференцировкой

На рис. 1-22 показано эволюционное происхождение эукариот в соответствии с симбиотической теорией. Следует отметить, что митохондрии и хлоропласты, проявляя определенное сходство с современными аэробными бактериями и цианобактериями, в то же время во многих отношениях отличаются от них. Например, количество ДНК в этих органеллах очень мало, большинство составляющих их молекул синтезируется вне органелл и лишь затем в них транспортируется. Если считать, что митохондрии и хлоропласты действительно возникли из симбиотических бактерий, то следует признать, что они претерпели значительные эволюционные изменения и стали весьма зависимыми от своих хозяев.

Для современных эукариот характерно не только наличие митохондрий, им присущ целый ряд особенностей, отличающих их от прокариот (табл. 1-1). Вместе все эти особенности наделяют эукариотические клетки большим количеством различных потенциальных возможностей, и трудно сказать, какая из них возникла раньше других. Заметим, что важнейшим шагом на пути эволюции было появление митохондрий в анаэробных эукариотических клетках, поскольку вместе с ними клетки получали эффективный источник энергии и могли направить ее на усложнение своих функций.

1.2.8. Эукариотические клетки содержат множество различных внутренних мембран

Объем эукариотических клеток, как правило, в 1000 и более раз превышает объем клеток прокариот. Соответственно больше в эукариотических клетках и разнообразного клеточного материала, например содержание ДНК в клетках человека в 1000 раз превышает ее количество в клетках бактерий. Известно, что именно на мембране протекает ряд важнейших реакций, связанных с поступлением в клетку сырья для метаболизма и выходом соответствующих продуктов во внеклеточное пространство. Вот почему большой объем эукариотических клеток требует значительного увеличения поверхности их мембраны по сравнению с клетками прокариот. Но согласно законам геометрии, при простом увеличении размеров какого-либо предмета его объем возрастает как куб линейного размера, а площадь поверхности - лишь как квадрат. Поэтому для сохранения необходимого соотношения площади поверхности и объема большие эукариотические клетки вынуждены увеличивать свою поверхность за счет изгибов, складок и других усложнений формы мембраны.

Сложность строения мембран - одна из основных особенностей всех эукариотических клеток. Мембраны окружают ядро, митохондрии и (у

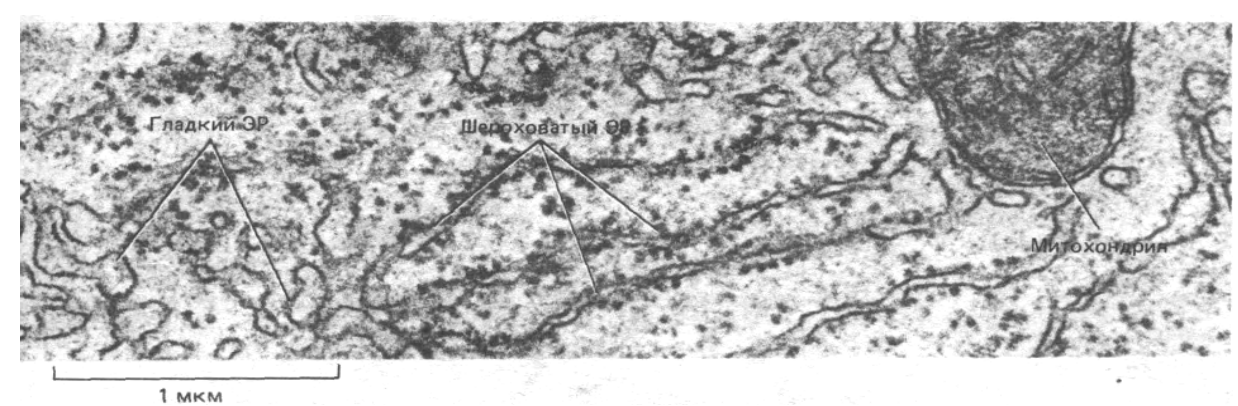


Рис. 1-23. Электронная микрофотография тонкого среза клетки млекопитающего, на которой виден гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭР). Участки гладкого ЭР участвуют в липидном обмене, участки шероховатого, усыпанные рибосомами, являются местами синтеза белков. Синтезированные белки покидают цитозоль и входят в некоторые другие компартменты клетки. (С любезного разрешения George Palade.)

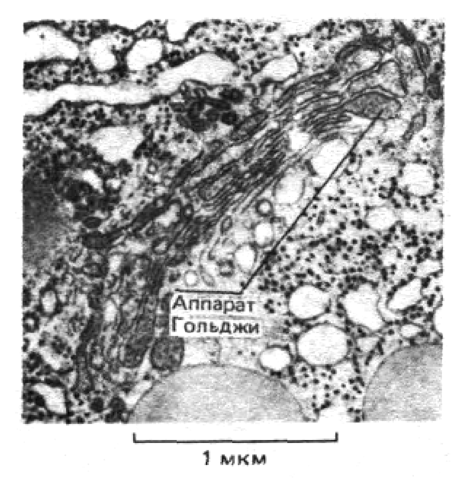


Рис. 1-24. Электронная микрофотография среза клетки млекопитающего. Виден аппарат Гольджи. Эта структура состоит из нескольких слоев уплощенных мембранных пузырьков (см. также схему 1-1). Аппарат Гольджи участвует в синтезе и упаковке материала, предназначенного для секреции из клетки, а также в транспорте новосинтезированных белков в отведенный для них клеточный компартмент. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

растений) хлоропласты. Они образуют лабиринт **эндоплазматического ретикулума** (рис. 1-23), где синтезируются липиды и мембранные белки, а также материал, предназначенный для экспорта из клетки. Мембраны формируют стопки уплощенных пузырьков, составляющих аппарат Гольджи (рис. 1-24), который тоже участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают **лизосомы,** содержащие запас ферментов, необходимых для внутриклеточного пищеварения, и таким образом защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Точно так же мембраны окружают **пероксисомы,** где в процессе окисления различных молекул образуются и разлагаются опасные высоко-реакционноспособные перекиси (пероксиды). Мембраны образуют также маленькие везикулы (пузырьки) и большие, заполненные жидкостью вакуоли (у растений). Все эти окруженные мембранами структуры соответствуют определенным компартментам цитоплазмы. В совокупности они занимают почти половину объема типичной живой клетки. Цитоплазматический компартмент, лишенный всех окруженных мембранами органелл, обычно называют **цитозолем.**

Все перечисленные нами мембранные структуры находятся внутри клетки. Как же в таком случае они могут влиять на площадь ее поверхности? Ответ заключается в том, что между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит обмен. Он осуществляется с помощью двух уникальных для эукариотических клеток процессов: *эндоцитоза* и *экзоцитоза.* При эндоцитозе некоторые участки наружной поверхностной мембраны впячиваются и отрываются, образуя цитоплазматические мембранные пузырьки, содержащие вещества, которые находились во внешней среде или были адсорбированы на поверхности клетки. Таким способом в цитоплазму могут попасть весьма крупные частицы и даже целые клетки *(фагоцитоз).* Экзоцитоз - обратный процесс, при котором внутриклеточные мембранные пузырьки сливаются с плазматической мембраной, высвобождая тем самым свое содержимое во внешнюю среду. Благодаря описанному механизму, расположенные глубоко внутри клетки и окруженные мембранами компартменты увеличивают эффективную поверхность клетки, участвующую в обмене веществ с внешней средой.

Как мы увидим в дальнейших главах, различные мембраны и окруженные ими компартменты эукариотических клеток стали высокоспециализированными: одни предназначены для секреции, другие - для всасывания, третьи - для определенных биосинтетических процессов и т. д.

1.2.9. Эукариотические клетки имеют скелет

Чем больше клетка, чем сложнее и специализированнее ее внутренние структуры, тем больше необходимость контролировать положение и перемещение этих структур. Все эукариотические клетки имеют внутренний скелет **цитоскелет,** определяющий форму клеток, их способность двигаться и перемещать органеллы из одной части клетки в другую. Цитоскелет образован сетью белковых волокон. Наиболее важные среди них - это *актиновые нити* и *микротрубочки* (рис. 1-25), которые, очевидно, возникли на очень ранних этапах эволюции, так как встречаются у всех эукариот практически в неизменном виде. И те, и другие участвуют в механизмах клеточных движений, например, актиновые нити (филаменты) обеспечивают мышечное сокращение, а микротрубочки являются основными структурными и силовыми элементами, обусловливающими движение *ресничек* и *жгутиков* - длинных выростов на поверхности некоторых клеток, биения которых напоминают удары бича.

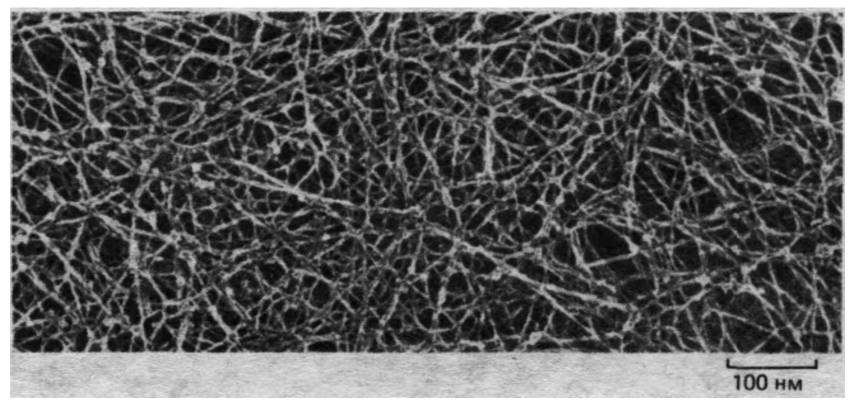


Рис. 1-25. На этой микрофотографии, полученной *с* помощью техники глубокого травления, видна сеть актиновых филаментов, подстилающая плазматическую мембрану животной клетки. (С любезного разрешения John Heuser.)

Актиновые нити и микротрубочки существенны также для внутренних перемещений, которые имеют место в цитоплазме эукариотических клеток. Так, микротрубочки в форме *митотического веретена* - важнейшая часть аппарата, обеспечивающего правильное распределение ДНК в процессе деления эукариотических клеток. Без микротрубочек эукариотические клетки просто не могли бы воспроизводиться, поскольку движение путем простой диффузии было бы либо слишком медленным, либо слишком неупорядоченным. Существует предположение, что большинство органелл эукариотических клеток прямо или косвенно прикреплены к цитоскелету и могут перемещаться только вдоль его направляющих элементов.

1.2.10. К царству простейших относятся наиболее сложные из известных клеток

Насколько сложно может быть устроена одиночная эукариотическая клетка, легче всего проиллюстрировать на примере *протистов* (рис. 1-26). Это свободноживущие одноклеточные эукариоты, возникшие разными эволюционными путями (см. рис. 1-16) и демонстрирующие чрезвычайное разнообразие форм и поведения: они могут быть фотосинтезирующими и хищными, подвижными и прикрепленными. Часто их характеризует сложное строение, например они могут включать чувствительные щетинки, фоторецепторы, жгутики, ногоподобные отростки, ротовой аппарат, жалящие иглы и мышечноподобные пучки сократительных волокон. Хотя все протисты являются одноклеточными, они могут быть организованы столь же сложно, как многие многоклеточные организмы. Все это особенно верно в отношении группы протистов, называемых **простейшими,** или «первыми животными».

Didinium - хищное простейшее. Оно имеет округлое тело диаметром около 150 мкм, окаймленное двумя рядами ресничек, передний край уплощен и имеет одиночный рылообразный выступ (рис. 1-27). Didinium быстро плавает в воде благодаря синхронным биениям своих ресничек. Встретив подходящую жертву (обычно другое простейшее, *Paramecium),* хищник выпускает из своего рыльца множество маленьких парализующих жал. Затем *Didinium* прикрепляется к *Paramecium* и пожирает ее, выворачиваясь как полый шар, чтобы поглотить клетку почти такого же размера, как он сам. Большую часть этого сложного поведения плавание, парализацию и поглощение жертвы - обеспечивают цитоскелетные структуры, подстилающие цитоплазматическую мембрану. Этот кортикальный слой включает, например, параллельные пучки микротрубочек, образующие сердцевину каждой реснички и обусловливающие способность к биениям.

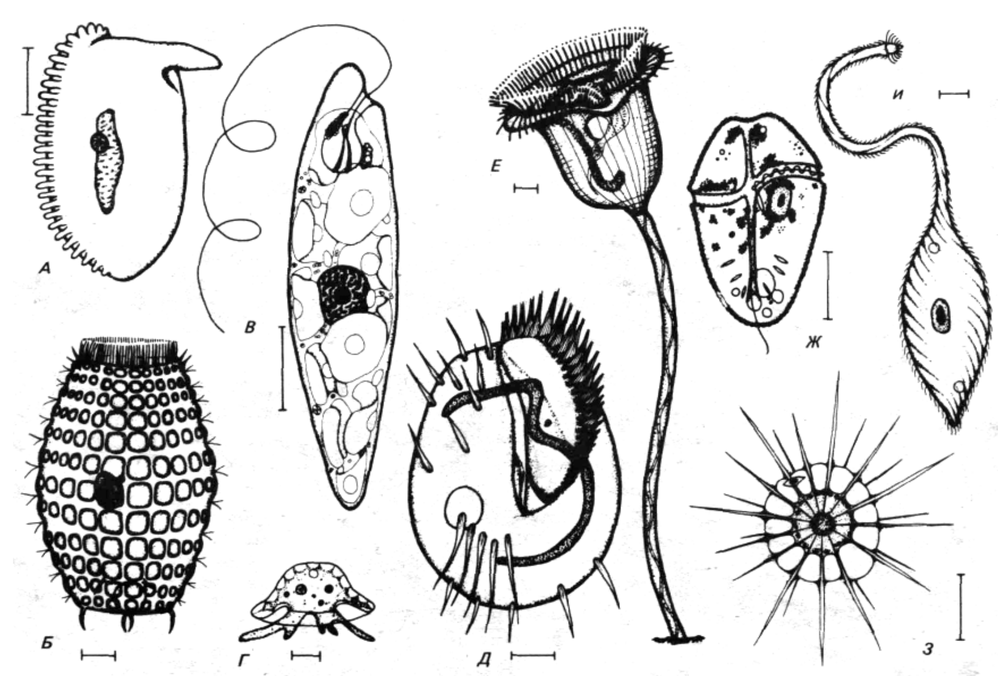


Рис. 1-26. Набор простейших, демонстрирующий огромное разнообразие этого класса одноклеточных организмов. Рисунки сделаны с разным увеличением, но для каждого организма приводится шкала в 10 мкм. Организмы *А, Б, Д, Е* и *И* принадлежат к реснитчатым, *В - к* эвгленовидным, Г - амебам, Ж - жгутиковым, З - солнечникам. (Из М. A. Sleigh, The Biology of Protozoa. London: Edward Arnold, 1973.)

Хищное поведение *Didinium,* а также свойства, благодаря которым оно реализуется: крупный размер, способность к фагоцитозу и способность двигаться, преследуя добычу, присущи исключительно эукариотам. Весьма вероятно, что эти свойства возникли очень рано в эволюции эукариот и именно это сделало возможным захват ими бактерий для «одомашнивания» в качестве митохондрий и хлоропластов.

1.2.11. Гены можно включать и выключать

Заметим, что простейшие при всей сложности их организации - это далеко не вершина эволюции эукариот. Более впечатляющие достижения на эволюционном пути были получены не путем концентрирования всяческих усложнений в одиночной клетке, а путем разделения обязан-

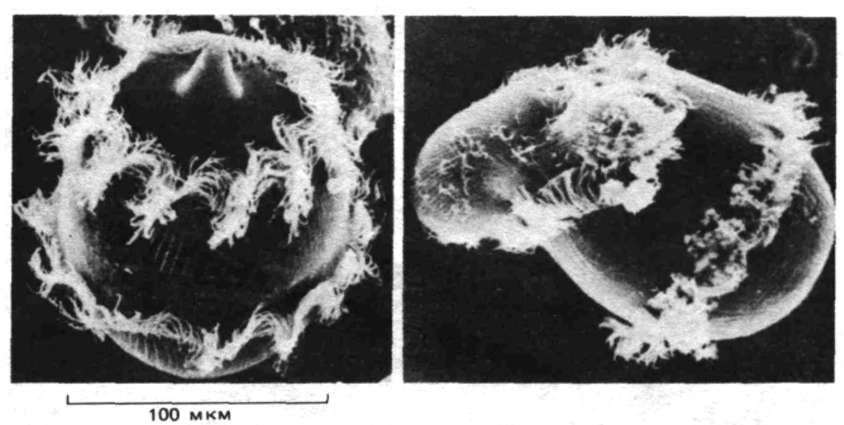


Рис. 1-27. Приведенная электронная микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. Видно, как простейшее пожирается другим простейшим. Простейшие - это одноклеточные животные, которым присуще поразительное разнообразие форм и поведения. Ресничная инфузория *Didinium (слева)* имеет два периферических кольца подвижных ресничек и рылообразный выступ спереди, с помощью которого она захватывает добычу. Справа показано, как *Didinium* заглатывает другое простейшее, *Paramecium.* (С любезного разрешения D. Barlow.)

ностей между различными типами клеток. Эволюция создала *многоклеточные организмы,* клетки которых, хотя и имеют одинаковое происхождение, претерпевают дифференцировку, в результате чего они становятся специализированными для выполнения определенных функций и образуют соответствующие органы.

Различные специализированные типы клеток одного и того же высшего растения или животного часто выглядят совершенно по-разному (схема 1-2). Это кажется парадоксальным, поскольку все клетки многоклеточного организма являются потомками одной и той же клетки-предшественницы, а именно оплодотворенной яйцеклетки. Общее происхождение подразумевает наличие одинаковых или сходных генов. Как же возникают различия? В редких случаях клетки при специализации теряют часть генетического материала крайним примером могут служить эритроциты млекопитающих, у которых в ходе дифференцировки теряется ядро. Однако подавляющее большинство клеток почти всех видов растений и животных сохраняет всю генетическую информацию, содержащуюся в оплодотворенной яйцеклетке. В основе специализации лежат не потеря или приобретение генов, а изменение в их *экспрессии.*

Даже бактерии не синтезируют постоянно все возможные типы белков и способны регулировать уровень происходящих в них процессов в соответствии с условиями внешней среды. Например, белки, необходимые для усваивания (метаболизма) лактозы, производятся некоторыми бактериями только в том случае, если этот сахар имеется в среде в виде единственного углевода. Другие бактерии, попав в неблагоприятные условия, прекращают большинство нормальных метаболических процессов и образуют споры, имеющие плотную непроницаемую наружную стенку и цитоплазму измененного состава.

У эукариотических клеток развились куда более сложные механизмы контроля экспрессии генов, затрагивающие целые системы взаимодействующих генных продуктов. Как внешние, так и внутренние сигналы активируют или подавляют группы генов. При дифференцировке клеток должны координированно измениться и состав мембран, и цитоскелет, и секретируемые продукты, и даже метаболизм. Сравните, например, приспособленную к сокращению клетку скелетной мышцы и остеобласт - секретирующий твердый матрикс кости - у одного и того же животного (схема 1-2). Столь радикальные различия в типе клеток обусловлены стабильными изменениями в экспрессии генов. Механизмы, контролирующие такие изменения, развились у эукариот до беспрецедентной для прокариот степени.

1.2.12. Клетки эукариот содержат значительно больше ДНК, чем это необходимо для кодирования белков

В эукариотических клетках очень много ДНК. Как мы уже говорили, в клетках человека ее почти в 1000 раз больше, чем в типичной бактериальной клетке, а в клетках некоторых амфибий в 10 раз больше, чем клетках человека (рис. 1-28). Однако, по-видимому, лишь малая часть этой ДНК (возможно, около 1 % в клетках человека) действительно кодирует белки. Зачем же нужны остальные 99% ДНК? Одна из гипотез состоит в том, что она просто увеличивает массу ядра. По другой гипотезе, эта ДНК - собрание бесполезных для клетки последовательностей, веками накапливавшихся в ней в результате использования клеточных механизмов синтеза для собственного размножения. Действительно, в ДНК многих видов обнаружены так называемые *мобильные* (подвижные) *элементы* - последовательности, способные внезапно «перепрыгивать» из одного участка ДНК в другой и даже

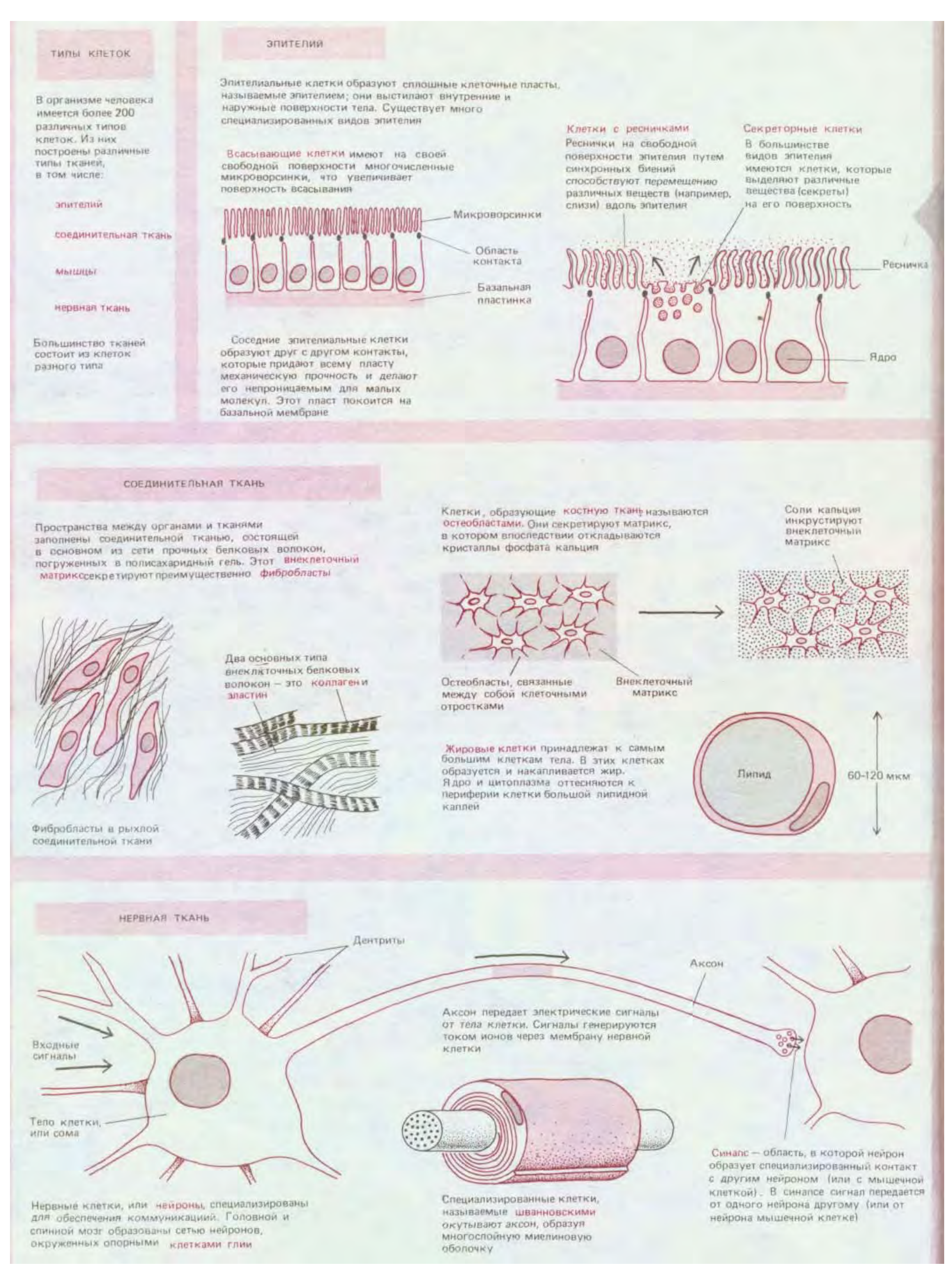
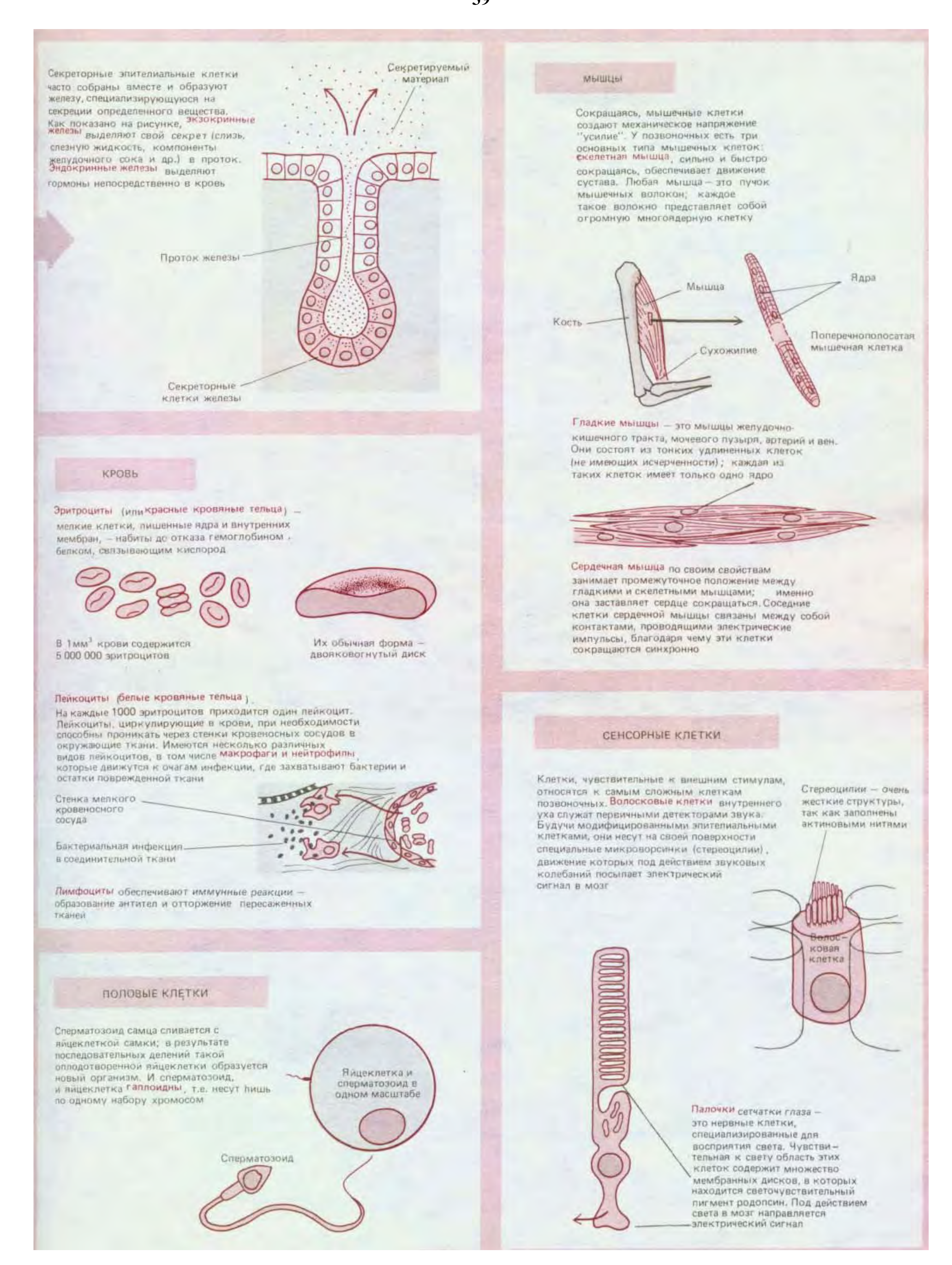


Схема 1-2. Некоторые типы клеток позвоночных животных.


Секреторные эпителиальные клетки часто собраны вместе и образуют железу, специализирующуюся на секреции определенного вещества. Как показано на рисунке, экзокринные железы выделяют свой секрет (слизь, слезную жидкость, компоненты желудочного сока и др.) в проток. Эндокринные железы выделяют гормоны непосредственно в кровь
Секретируемый материал
Проток железы
Секреторные клетки железы
КРОВЬ
Эритроциты (или красные кровяные тельца) – мелкие клетки, лишенные ядра и внутренних мембран, – набиты до отказа гемоглобином, белком, связывающим кислород
В 1мм³ крови содержится 5 000 000 эритроцитов
Их обычная форма – двояковогнутый диск
Лейкоциты (белые кровяные тельца).
На каждые 1000 эритроцитов приходится один лейкоцит. Лейкоциты, циркулирующие в крови, при необходимости способны проникать через стенки кровеносных сосудов в окружающие ткани. Имеются несколько различных видов лейкоцитов, в том числе макрофаги и нейтрофилы, которые движутся к очагам инфекции, где захватывают бактерии и остатки поврежденной ткани
Стенка мелкого кровеносного сосуда
Бактериальная инфекция в соединительной ткани
Лимфоциты обеспечивают иммунные реакции – образование антител и отторжение пересаженных тканей
ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ
Сперматозоид самца сливается с яйцеклеткой самки; в результате последовательных делений такой оплодотворенной яйцеклетки образуется новый организм. И сперматозоид, и яйцеклетка гаплоидны, т.е. несут лишь по одному набору хромосом
Яйцеклетка и сперматозоид в одном масштабе
Сперматозоид
МЫШЦЫ
Сокращаясь, мышечные клетки создают механическое напряжение "усилие". У позвоночных есть три основных типа мышечных клеток: скелетная мышца, сильно и быстро сокращаясь, обеспечивает движение сустава. Любая мышца – это пучок мышечных волокон; каждое такое волокно представляет собой огромную многоядерную клетку
Мышца
Кость
Сухожилие
Ядра
Поперечнополосатая мышечная клетка
Гладкие мышцы – это мышцы желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, артерий и вен. Они состоят из тонких удлиненных клеток (не имеющих исчерченности); каждая из таких клеток имеет только одно ядро
Сердечная мышца по своим свойствам занимает промежуточное положение между гладкими и скелетными мышцами; именно она заставляет сердце сокращаться. Соседние клетки сердечной мышцы связаны между собой контактами, проводящими электрические импульсы, благодаря чему эти клетки сокращаются синхронно
СЕНСОРНЫЕ КЛЕТКИ
Клетки, чувствительные к внешним стимулам, относятся к самым сложным клеткам позвоночных. Волосковые клетки внутреннего уха служат первичными детекторами звука. Будучи модифицированными эпителиальными клетками, они несут на своей поверхности специальные микроворсинки (стереоцилии), движение которых под действием звуковых колебаний посылает электрический сигнал в мозг
Стереоцилии – очень жесткие структуры, так как заполнены актиновыми нитями
Волосковая клетка
Палочки сетчатки глаза – это нервные клетки, специализированные для восприятия света. Чувствительная к свету область этих клеток содержит множество мембранных дисков, в которых находится светочувствительный пигмент родопсин. Под действием света в мозг направляется электрический сигнал

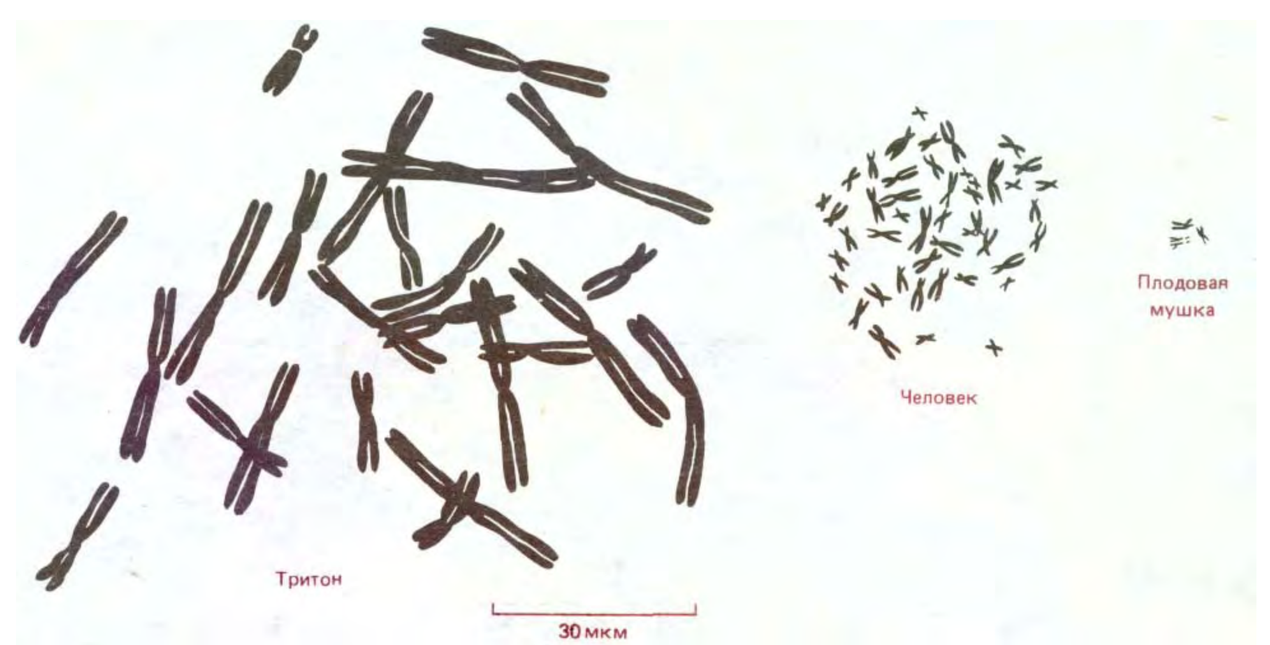


Рис. 1-28. Сравнение хромосом тритона, человека и плодовой мушки, представленных в одном масштабе. Если судить по общему размеру хромосом, на одну клетку у человека приходится больше ДНК, чем у плодовой мушки, но меньше, чем у тритона. Некоторые растения, такие, как лилия, имеют больше ДНК, чем некоторые животные. (По данным H. C. Macgregor, Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), 283, 309-318, 1978.)

встраивать в новые места свои дополнительные копии. Мобильные элементы могут, таким образом, размножаться, подобно медленно развивающейся инфекции, составляя все более увеличивающуюся часть генетического материала.

Но эволюция использует все возможности. Вне зависимости от происхождения некодирующей ДНК сейчас она, наверняка, выполняет какую-то важную функцию. Например, часть этой ДНК играет структурную роль, позволяя генетическому материалу конденсироваться или «упаковываться» определенным образом. Другая часть «лишней» ДНК - регуляторная и участвует во включении и выключении генов, направляющих синтез белков, играя, таким образом, ключевую роль в сложных механизмах регуляции экспрессии генов эукариотической клетки.

1.2.13. Генетический материал эукариотических клеток упакован очень сложно

ДНК эукариотических клеток имеет столь большую длину, что риск ее запутывания или разрыва очень велик. Вероятно, по этой причине в процессе эволюции возникли *гистоны* - характерные для эукариот белки, связывающиеся с ДНК и скручивающие ее в компактные и более удобные для ряда клеточных процессов **хромосомы** (рис. 1-29). Уплотнение хромосом является существенной частью подготовки эукариотических клеток к делению (рис. 1-30). ДНК всех эукариот (за одним небольшим исключением) связана с гистонами. Об исключительно важном значении этих белков свидетельствует тот факт, что они ведут себя крайне консервативно в процессе эволюции: некоторые из гистонов гороха идентичны (с точностью до аминокислоты) соответствующим гистонам коровы.

В эукариотических клетках с ДНК кроме гистонов связано множество других белков. Некоторые из них, влияя на способность ДНК взаимодействовать с разнообразными молекулами, изменяют набор экспрессирующихся генов, отличающий один тип специализированных клеток от другого.

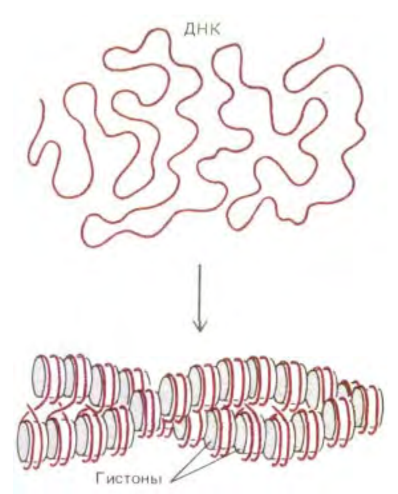


Рис. 1-29. Схема, показывающая, как положительно заряженные белки, называемые пистонами, способствуют скручиванию ДНК в хромосомах.

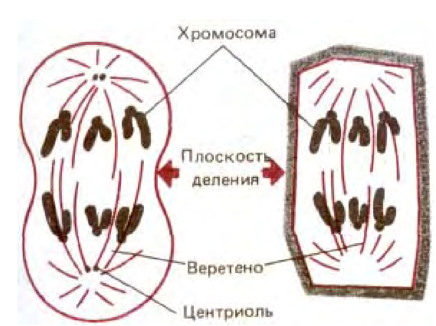


Рис. 1-30. Схематическое изображение эукариотической клетки в митозе. Слева - животная клетка, справа - растительная. Ядерная оболочка разрушена, а реплицированная ДНК сконденсирована в два полных набора хромосом. Митотическое веретено, состоящее в основном из микротрубочек, распределяет по одному набору хромосом в каждую из новообразующихся клеток.

Мембраны, окружающие ядра эукариотических клеток, защищают связанный с ДНК тонкий механизм контроля от многих происходящих в цитоплазме химических изменений. Кроме того, они позволяют пространственно разобщить две ключевые стадии экспрессии генов: 1) синтез РНК по матрице ДНК *(транскрипцию ДНК)* и 2) использование этих последовательностей РНК для синтеза определенных белков *(трансляцию РНК)*. В прокариотических клетках нет такой компартментации и трансляция РНК с образованием белка происходит по мере образования РНК при транскрипции, начинаясь раньше, чем завершился синтез РНК. У эукариот, напротив (за исключением митохондрий и хлоропластов, которые в этом отношении, как и в других, ближе к бактериям), указанные этапы пути от гена к белку строго разобщены: транскрипция происходит в ядре, трансляция - в цитоплазме. РНК, прежде чем включиться в процессы синтеза белка, должна покинуть ядро. Для этого, находясь в ядре, РНК претерпевает сложный процесс созревания *(процессинг)*, в ходе которого одни части молекулы РНК удаляются, а другие модифицируются.

Сложность организации генома в клетках эукариот обусловливает присутствие в них более тонких и разнообразных механизмов регуляции нежели те, которые обнаруживаются в клетках бактерий.

Заключение

Все существующие ныне клетки подразделяются на два типа: прокариотические (бактерии и их близкие родственники) и эукариотические. Считают, что первые близки в общих чертах с самыми ранними клетками-прародительницами. Несмотря на сравнительную простоту строения, клетки прокариот весьма разнообразны в биохимическом отношении, например, у бактерий можно обнаружить все основные метаболические пути, включая три главных процесса получения энергии - гликолиз, дыхание и фотосинтез. Эукариотические клетки больше по размеру и имеют более сложную организацию, чем клетки прокариот. Они содержат больше ДНК и различных компонентов, обеспечивающих ее сложные функции. ДНК эукариот заключена в окруженное мембраной ядро, а в цитоплазме находится много других окруженных мембранами органелл. К ним относятся митохондрии, осуществляющие окончательное окисление молекул пищи, а также (в растительных клетках) хлоропласты, в которых идет фотосинтез. Целый ряд данных свидетельствует о происхождении митохондрий и хлоропластов от ранних прокариотических клеток, ставших внутренними симбионтами большей по размеру анаэробной клетки. Другая отличительная особенность эукариотических клеток - это наличие цитоскелета из белковых волокон, организующего цитоплазму и обеспечивающего механизм движения.

1.3. От клеток - к многоклеточным организмам

Одноклеточные организмы, вроде бактерий и простейших, столь успешно адаптировались к разнообразным условиям среды, что составляют более половины всей биомассы Земли. В отличие от высших животных многие из этих одноклеточных способны синтезировать все необходимые им вещества из нескольких простых соединений, причем некоторые из них делятся чаще, чем раз в час. Чем же тогда объяснить появление и распространение на Земле многоклеточных организмов? По-видимому, их преимущество состоит в том, что такие организмы могут использовать ресурсы, недоступные единичной клетке. Например, наличие множества клеток позволяет дереву достичь больших размеров, иметь корни в земле (где определенные клетки поглощают воду и пита-

тельные вещества) и листья в воздухе (где другие клетки могут эффективно улавливать энергию солнечных лучей). Ствол дерева состоит из специализированных клеток, образующих каналы для транспорта воды и питательных веществ между листьями и корнями. Другая группа специализированных клеток образует слой коры, предотвращающий потерю воды и защищающий внутреннюю часть ствола. Дерево как целое не конкурирует с одноклеточными организмами за свою экологическую нишу, его способ выживания и размножения совершенно иной. По мере появления различных растений и животных изменялась и среда, в которой проходила эволюция, а это в свою очередь требовало новых способностей, ведь существование в джунглях, например, предполагает наличие у организмов совершенно иных свойств, чем жизнь в открытом море. Возникновение новых способов движения, сенсорного восприятия, коммуникаций, социальной организации - все это позволило эукариотическим организмам конкурировать, размножаться и заселять пространства Земли.

1.3.1. Одиночные клетки способны объединяться и образовывать колонии

Вполне вероятно, что ранней стадией эволюции многоклеточных явилось объединение одноклеточных организмов в колонии. Достигнуть этого проще всего, если дочерние клетки не расходятся после каждого клеточного деления. В примитивном виде такое общественное поведение встречается даже у прокариот. Например, миксобактерии, которые живут в почве и питаются нерастворимыми органическими молекулами, расщепляют их, секретируя специальные ферменты. Они образуют рыхлые колонии, в которых накапливаются ферменты от индивидуальных клеток и, таким образом, повышается эффективность питания (эффект «волчьей стаи»). Эти клетки представляют собой вершину структурной сложности, достигнутой эволюцией прокариот: когда истощаются запасы питательных веществ, они плотно агрегируют и образуют *плодовое тело* (рис. 1-31), в котором бактерии дифференцируются в споры, способные выжить даже в исключительно суровых условиях.

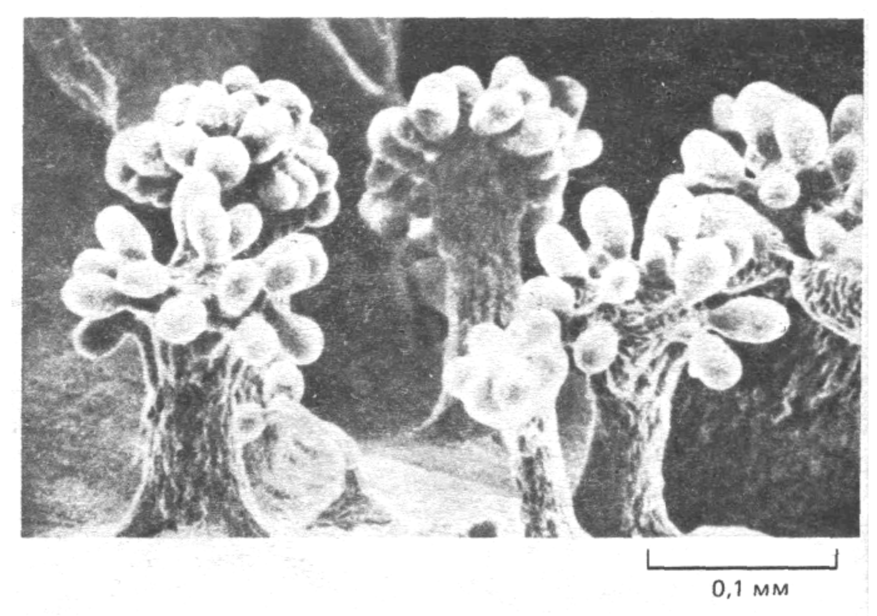
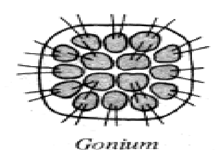
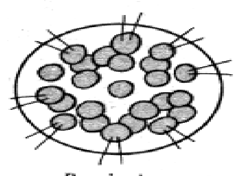


Рис. 1-31. Микрофотография (сканирующий электронный микроскоп) плодовых тел, образованных миксобактериями *(Chondromyces crocatus).* Каждое плодовое тело, заполненное спорами, образовалось в результате агрегации и дифференцировки примерно миллиона миксобактерии. (Из P. L. Grilione, J. Pangborn, J. Bacteriol., 124, 1558-1565, 1975.)







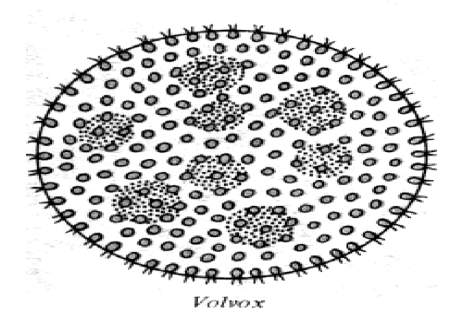


Рис. 1-32. Четыре близких рода зеленых водорослей, иллюстрирующих развитие от одноклеточной к колониальной и далее к многоклеточной организации.

Когда условия становятся более благоприятными, споры плодового тела прорастают и образуют новое скопление бактерий.

Зеленые водоросли (не путать с прокариотическими синезелеными водорослями, или цианобактериями) - это эукариоты, существующие в виде одноклеточных организмов, колоний и многоклеточных форм. Различные виды зеленых водорослей можно расположить в порядке возрастания сложности, иллюстрирующем последовательность эволюции, которую, видимо, прошли высшие растения и животные. Одноклеточные зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas,* напоминают жгутиковых простейших, но в отличие от них имеют хлоропласты и способны к фотосинтезу. У близких родов группы жгутиковых клеток образуют колонии, удерживаемые вместе матриксом из секретируемых самими же клетками молекул. Наиболее просто организованные виды (принадлежащие к роду *Gonium)* имеют форму вогнутого диска, состоящего из 4, 8, 16 или 32 клеток. Биения их жгутиков независимы друг от друга, но ориентированы в одном направлении, поэтому они способны приводить колонию в движение. Каждая клетка такой колонии равноценна любой другой, и деление каждой клетки может дать начало новой колонии. В других родах можно обнаружить большие по размерам колонии. Наиболее примечательный пример - род *Volvox;* некоторые его виды содержат до 50 000 и более клеток, образующих полый шарик. У представителей рода *Volvox* индивидуальные клетки колонии соединены тонкими цитоплазматическими мостиками, так что биение жгутиков координированы и вся колония движется подобно катящемуся шарику (рис. 1-32). В колонии *Volvox* наблюдается некоторое разделение функций - за воспроизведение отвечает небольшое количество клеток, служащих предшественниками новых колоний. Остальные клетки столь зависимы друг от друга, что неспособны к самостоятельному существованию, и разрушенная колония погибает.

1.3.2. Клетки высших организмов становятся специализированными и взаимозависимыми

В определенном смысле *Volvox* больше напоминает многоклеточный организм, чем просто колонию. При движении в воде биения жгутиков синхронизированы, колония структурно и функционально асимметрична. Она способна двигаться по направлению к отдаленному источнику света. Репродуктивные клетки обычно локализуются с одного края колонии, там они делятся и образуют новые миниатюрные колонии, укрытые вначале внутри родительского шарика. Таким образом, у *Volvox* в примитивной форме проявляются две существенные черты всех многоклеточных организмов: клетки *специализируются* и *кооперируются. С* помощью специализации и кооперации клетки образуют единый координированный организм, обладающий более широкими возможностями, чем любая из составляющих его частей.

Организованные формы дифференцировки клеток встречаются даже у некоторых прокариот, например, многие цианобактерии не расходятся после деления, образуя нитевидные цепочки до метра длиной. Через регулярные интервалы в такой цепочке встречаются изменившиеся клетки, способные включать атмосферный азот в органические молекулы. Эти немногие специализированные клетки осуществляют фиксацию азота не только для себя, но и для соседних клеток, с которыми они обмениваются продуктами метаболизма. Однако эукариотические клетки добились значительно больших успехов в таком «разделении труда». И именно они, а не прокариоты являются теми живыми единицами, из которых построены все наиболее сложные многоклеточные организмы.

1.3.3. В основе многоклеточной организации лежит взаимодействие клеток

Чтобы образовать многоклеточный организм, клетки должны быть как-то связаны друг с другом. Эукариоты развили целый ряд приспособлений для осуществления этой функции. У *Volvox,* как уже отмечалось, клетки не полностью расходятся при делении, а остаются соединенными цитоплазматическими мостиками. У высших растений клетки не только связаны цитоплазматическими мостиками - *плазмодесмами,* но и заключены в жесткие «соты» со стенками из целлюлозы (клеточные стенки), которую сами клетки и секретируют.

Клетки большинства животных не имеют жестких стенок, а цитоплазматические мостики у них редки. Вместо этого клетки объединены сравнительно рыхлой сетью больших внеклеточных органических молекул (называемых *внеклеточным матриксом),* а также за счет слипания (адгезии) их плазматических мембран. Например, организм *губок* (их обычно считают наиболее примитивными из современных животных), как правило, состоит из пяти типов специализированных клеток, образующих оболочку тела с системой пор и каналов для прокачивания воды, из которой клетки отфильтровывают и поглощают частички пищи. Благодаря делению клеток, губки неограниченно растут: их размер и структура точно не предопределены. Они лишены нервной системы, которая могла бы координировать активность различных частей организма. Их можно описать как «свободную республику клеток» в отличие от более строго организованных клеточных сообществ, характерных для высших животных. Если продавить губку через тонкое сито, чтобы механически разделить отдельные клетки, эти клетки могут иногда самопроизвольно собраться в целую губку: сначала клетки агрегируют в большую неупорядоченную массу, а затем перегруппировываются в организованный многоклеточный слой. Такие слои клеток называют **эпителием.**

1.3.4. Эпителиальные слои клеток окружают защищенную от внешних воздействий внутреннюю среду организма

Из всех способов взаимосвязи клеток в тканях многоклеточных животных наиболее фундаментальное значение, видимо, имеет эпителиальная организация. В эволюции сложных многоклеточных организмов эпителиальный слой сыграл столь же большую роль, как и клеточная мембрана в эволюции сложных одиночных клеток.

Значение эпителиальных слоев легко проиллюстрировать на примере другой группы низших организмов - *кишечнополостных,* которые на эволюционной лестнице стоят на ступеньку выше губок, так как имеют что-то вроде нервной системы. Эта группа животных включает в себя медуз, актиний, коралловые полипы, а также *гидру,* маленький пресноводный организм. Тело кишечнополостных состоит из двух слоев эпителия: наружного - *эктодермы* и *внутреннего - энтодермы.* Энтодермальный слой окружает гастроваскулярную полость, в которой происходит переваривание пищи (рис. 1-33). Некоторые энтодермальные клетки секретируют пищеварительные ферменты в гастроваскулярную полость, другие осуществляют всасывание и дальнейшее переваривание пищевых молекул, образовавшихся под действием этих ферментов. Образуя плотный эпителиальный слой, клетки энтодермы препятствуют выходу всех этих молекул в окружающую среду. В результате в гастроваскулярной полости создаются условия, необходимые для нормального пищеварения. В то же время обращенные наружу клетки эктодермы сохранили специализацию, полезную при взаимоотношениях с внешним миром.

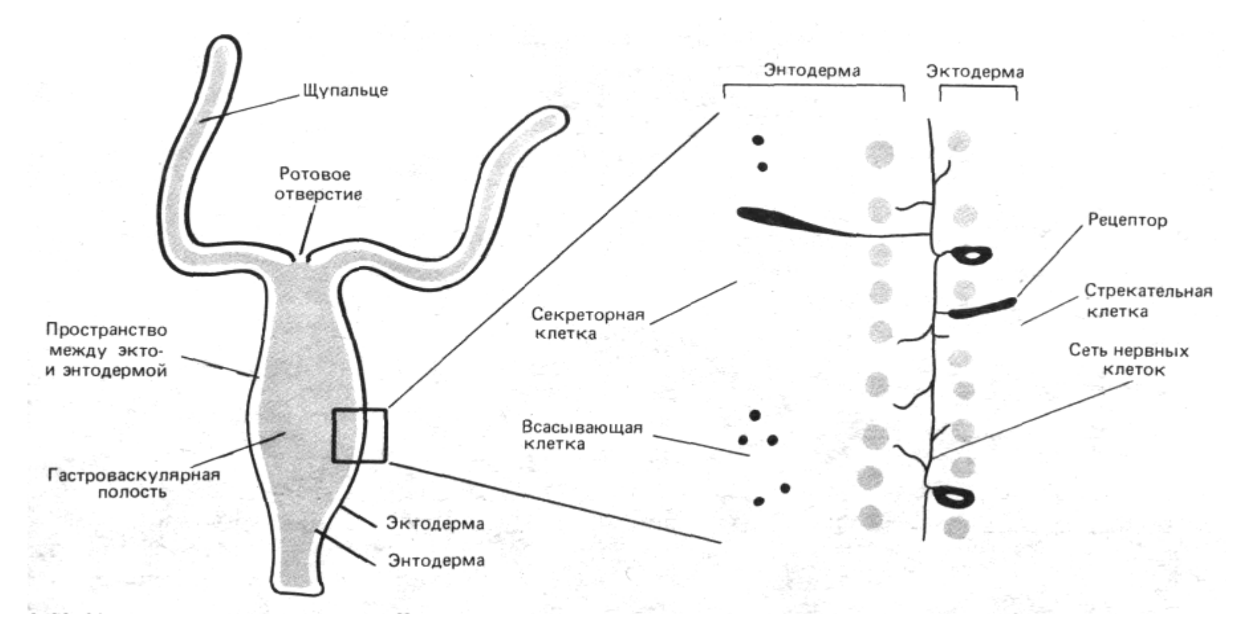


Рис. 1-33. Строение тела гидры. Наружный слой клеток (эктодерма) выполняет защитные, чувствительные функции и функции захвата добычи, а внутренний слой (энтодерма) в основном участвует в пищеварении. Оба клеточных пласта способны к сокращению (т. е. выступают в роли мышц), что дает возможность животному двигаться. Между этими слоями расположена сеть взаимосвязанных нервных клеток, которые координируют движение.

В эктодерме, например, есть специальные клетки *(стрекательные клетки),* содержащие капсулу, заполненную ядовитой жидкостью. Плотная стенка этой капсулы в дистальной части образует спирально закрученную стрекательную нить, способную выбрасываться и парализовать тех мелких животных, которыми гидра питается. Большинство других экто- и энтодермальных клеток обладают мышечноподобными свойствами, что дает возможность гидре двигаться, как и положено хищнику.

Между эктодермой и энтодермой находится еще один компартмент, отделенный как от гастроваскулярной полости, так и от внешней среды. Здесь в узком замкнутом пространстве между эпителиальными клетками расположены нервные клетки. Под внешней поверхностью формируются специализированные клеточные контакты, образующие непроницаемый барьер. Сокращая мышечноподобные клетки эктодермы и энтодермы, животное способно изменять форму и двигаться. Контроль и координацию этих сокращений осуществляют нервные клетки, которые способны проводить электрические сигналы (рис. 1-33, 1-34 и 1-35). Как мы увидим в дальнейшем, для нормального функционирования нервных клеток критическое значение имеет концентрация простых неорганических ионов в окружающей среде. Большинство нервных клеток, в том числе и наши собственные, приспособлены для работы в растворе, ионный

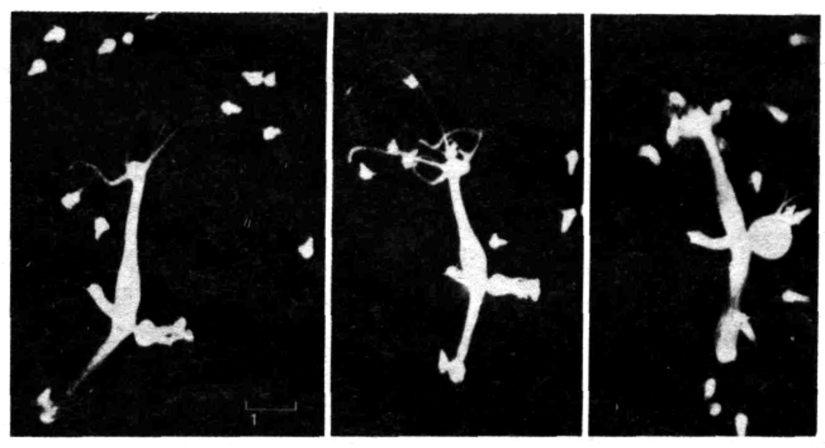


Рис. 1-34. Гидра может проявлять достаточно сложную активность. На фотографии видно, как она захватывает своими щупальцами дафнию и засовывает свою добычу в гастроваскулярную полость для переваривания. (С любезного разрешения Amata Horubruch.)

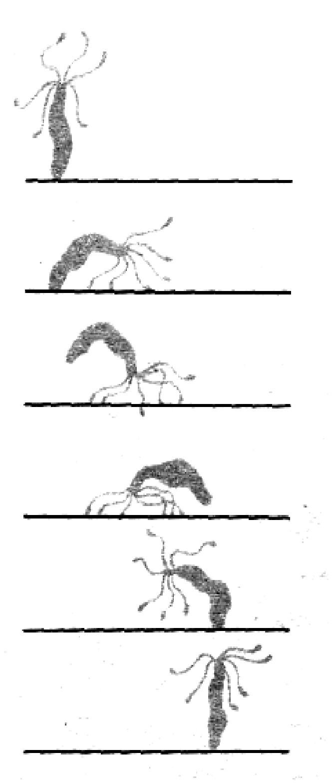


Рис. 1-35. Гидра может плавать, скользить на своей подошве или, как показано здесь, перемещаться кувыркаясь.

состав которого аналогичен составу морской воды, что, видимо, отражает условия возникновения первой нервной клетки. Большинство кишечнополостных по-прежнему обитает в море, но не все. В частности, гидра живет в пресной воде. Очевидно, что заселение этой новой среды обитания оказалось возможным лишь в силу того, что нервные клетки гидры находятся в замкнутом и изолированном от внешней среды пространстве, образованном слоями эпителиальных клеток, которые поддерживают внутреннюю среду, необходимую для функционирования нервных клеток.

1.3.5. Межклеточные коммуникации определяют пространственное строение многоклеточных организмов

Клетки гидры связаны между собой не только механически, но и с помощью специальных контактов, изолирующих внутреннюю часть организма от внешней среды. Известно, что клетки этого организма способны передавать сигналы по всей длине тела. Если отрезать один конец гидры, оставшиеся клетки среагируют на отсутствие ампутированной части изменением своих свойств и перестроятся так, чтобы регенерировать целое животное. Очевидно, что от одной части организма к другой передаются сигналы, управляющие развитием формы тела, со щупальцами и ртом на одном конце и стебельком на другом. Более того, эти сигналы независимы от нервной системы. Если развивающуюся гидру обработать ядом, препятствующим образованию нервных клеток, то животное потеряет способность двигаться, ловить добычу и питаться. Однако его пищеварительные системы будут по-прежнему работать нормально, так что любой человек, достаточно терпеливый, чтобы вкладывать обычную добычу гидры ей в рот, сможет поддерживать ее существование. Форма тела у таких принудительно питаемых животных нормальная, и утерянные части регенерируют точно так же, как у животных с интактной нервной системой.

В ходе эволюции из просто устроенных организмов, похожих на кишечнополостных, развились высшие животные. Сложная организация последних обусловлена более изощренным использованием тех же принципов кооперирования клеток, которые лежат в основе строения гидры. Слои эпителиальных клеток выстилают все внутренние и наружные поверхности тела, создавая защищенные от внешних условий компартменты и контролируемую внутреннюю среду, в которой дифференцированные клетки выполняют специализированные функции. Специализированные клетки взаимодействуют и сообщаются друг с другом с помощью сигналов, управляющих свойствами каждой клетки в зависимости от ее места в общей структуре. Однако, чтобы понять, как устроен такой большой многоклеточный организм со сложной и точной организацией, каким является человек, необходимо более подробно рассмотреть последовательность событий при его развитии.

1.3.6. Клеточная память позволяет развиваться сложным формам

Клетки почти всех многоклеточных организмов возникают в результате последовательных делений одной-единственной клетки-предшественника, следовательно, они представляют собой *клон.* По мере деления и роста клеток происходит их дифференцировка, т.е. они начинают отличаться от других по своей структуре, метаболизму и функциям. Изменения эти происходят в ответ на сигналы, поступающие от соседних клеток. Примечательно, что эукариотические клетки и их потомство обычно сохраняют свое специализированное состояние даже после того, как влияние, вызвавшее дифференцировку, исчезает, другими словами, у

этих клеток есть память. А это значит, что их конечные свойства определяются не только тем окружением, в котором они в конце концов оказались, а всей совокупностью влияний, которым они подвергались в ходе развития организма. Таким образом, по мере роста и развития постепенно проявляются все более и более тонкие детали плана строения взрослого организма. Так создается организм постепенно увеличивающейся сложности, окончательная форма которого является выражением длительной истории индивидуального развития.

1.3.7. Основные программы развития имеют тенденцию сохраняться в процессе эволюции

Строение животного является результатом его эволюционной истории, которая, как и история индивидуального развития, представляет собой летопись продвижения от простого к сложному. Каково же взаимоотношение этих двух аспектов развития - эволюционного и индивидуального? В процессе эволюции многие приспособления, использовавшиеся при индивидуальном развитии простейших многоклеточных организмов, сохранились в качестве основных принципов строения их более сложных потомков. Мы уже упоминали об эпителиальной организации клеток. Заслуживает внимания и тот факт, что некоторые специализированные типы клеток, например нервные клетки, можно найти практически у любого животного - от гидры до человека. Более того, ранние стадии

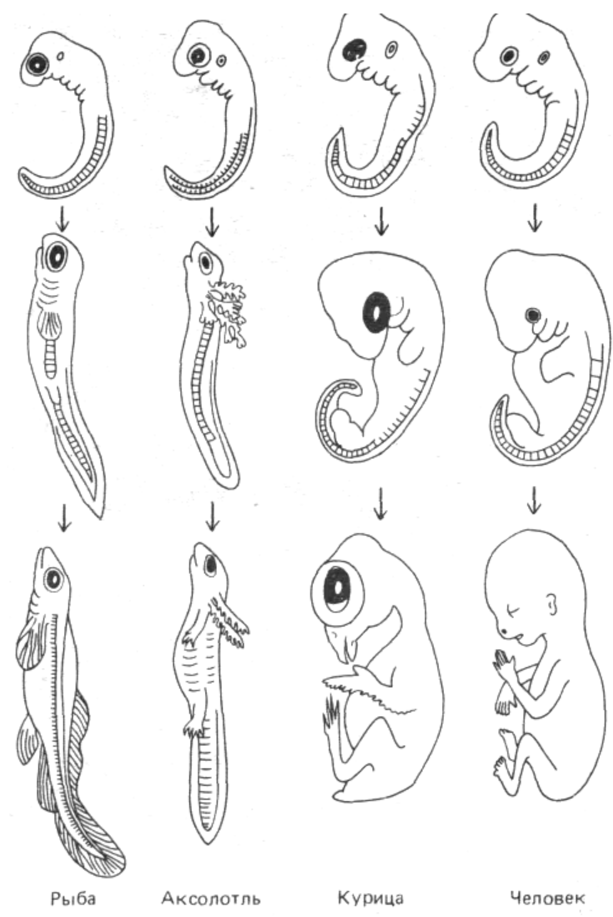


Рис. 1-36. Сравнение эмбрионального развития рыбы, амфибии, птицы и млекопитающего. Ранние стадии *(вверху)* очень похожи, более поздние стадии *(внизу)* различаются сильнее. (Из E. Haeckel, Anthropogenie, oder Entwickelungsgeschichte des Menschen. Leipzig, Engelmann, 1874.)

индивидуального развития животных, взрослые формы которых совершенно различны, часто бывают удивительно похожи. Так, например, лишь специалист способен отличить куриный эмбрион от эмбриона человека на ранней стадии развития (рис. 1-36).

Подобные наблюдения нетрудно объяснить. Рассмотрим процесс возникновения в ходе эволюции новой анатомической особенности, скажем удлиненного клюва. Случайная мутация изменяет аминокислотную последовательность белка и, следовательно, его биологическую активность. Измененный белок может повлиять на клетки, ответственные за образование клюва таким образом, что в результате получится более длинный клюв. Но мутация должна быть совместима с развитием остальных частей организма - лишь в этом случае она будет подхвачена естественным отбором. Удлинение клюва вряд ли окажется выгодным, если оно сочетается с утерей языка или отсутствием ушей. Такие катастрофические последствия более вероятны в случае мутаций, затрагивающих ранние стадии индивидуального развития, чем в случае мутаций, влияющих на его поздние этапы. Ранние эмбриональные клетки подобны картам в основании карточного домика - от них зависит слишком многое, и даже незначительное изменение их свойств скорее всего приведет к печальным последствиям. Ранние стадии индивидуального развития оказались «замороженными» - так же точно, как в биохимической организации клеток «заморожены» генетический код и механизмы биосинтеза белка. В отличие от этого клетки, образующиеся на последних стадиях развития, имеют больше возможностей для изменений. Вероятно, именно по этой причине на ранних стадиях развития эмбрионы разных видов столь часто бывают похожи друг на друга и в процессе индивидуального развития, видимо, нередко повторяют пройденные ими этапы эволюции.

1.3.8. Эукариотические организмы имеют сложный аппарат воспроизведения

У многоклеточных организмов должны быть клетки, служащие предшественниками новых поколений. У высших растений и животных эти клетки весьма специализированы и называются первичными половыми или *зародышевыми клетками.* От них зависит размножение вида, и мощное давление отбора приводит структуру организма в целом в соответствие с требованием максимальной вероятности выживания зародышевых клеток. Прочие клетки могут погибнуть, но до тех пор, пока живы зародышевые клетки, будут появляться новые организмы, аналогичные родительскому. В этом смысле наиболее фундаментальное различие в многоклеточном организме существует между зародышевыми клетками и всеми остальными, т. е. между зародышевыми и соматическими клетками.

Не все многоклеточные организмы воспроизводятся с помощью специальных дифференцированных клеток. Многие простые животные (среди них губки и кишечнополостные) способны размножаться почкованием. Аналогичный способ используется многими растениями. Для **полового размножения,** однако, необходимы зародышевые клетки. Процесс полового размножения столь хорошо известен, что кажется простым, хотя он несомненно сложнее неполового воспроизведения и требует мобилизации значительных ресурсов. Две особи одного вида, но разного пола обычно производят совершенно различные зародышевые (половые) клетки: одна *особь - яйцеклетки, другая - сперматозоиды.* Яйцеклетка сливается со сперматозоидом с образованием зиготы - клетки, генотип которой представляет собой случайным образом перетасованный набор генов двух родителей. Практически все виды эукариот, как многоклеточ-

ные, так и одноклеточные (даже те, которые могут размножаться другими способами), способны к половому размножению. Развитию полового размножения вместо более простых стратегий, основанных на обыкновенном делении клеток, должны были способствовать мощные силы естественного отбора. Хотя трудно с уверенностью указать все преимущества, которые дает при отборе половое размножение, ясно по крайней мере, что этот процесс создает возможность перетасовывания и комбинирования генов. Половое размножение могло сыграть ведущую роль в эволюции новых генов и их комбинаций и таким образом внести свой вклад в бесконечное разнообразие форм и функций современных растений и животных.

1.3.9. Клетки позвоночных имеют более 200 различных типов специализации

Число различных специализаций, которые можно обнаружить у клеток высших животных, неизмеримо больше, чем у любого прокариотического организма. У позвоночных четко различают более 200 **клеточных типов,** причем многие из них, видимо, объединяют под общим названием большое количество более тонко различающихся вариантов. На схеме 1-2 представлено лишь несколько типов клеток. Несмотря на чрезвычайное разнообразие функций клеток, даже в пределах одного организма можно убедиться в их удивительной универсальности. Многие современные представления об общих свойствах клеток эукариот основаны на изучении специализированных типов, у которых исключительно сильно развито определенное полезное свойство, в той или иной степени присущее всем клеткам. Каждая особенность и каждая органелла (представленные на схеме 1-1) развиты в необычайно высокой степени или особенно четко выражены у того или другого типа клеток. В качестве произвольного примера рассмотрим нервно-мышечное соединение, в образовании которого участвуют клетки трех типов: мышечные, нервные и шванновские. Клетки каждого типа играют только им присущую роль (рис. 1-37).

1. Специализация мышечной клетки - сокращение. Ее цитоплазма заполнена упорядоченными рядами белковых нитей, в том числе актиновых. В промежутках между ними находится множество митохондрий, поставляющих ATP в качестве топлива для сократительного аппарата.

2. Нервная клетка стимулирует сокращение мышцы, подводя к ней возбуждающий сигнал от головного или спинного мозга. Поэтому нервная клетка необычайно вытянута: ее тело, содержащее ядро, может находиться на расстоянии метра или более от места соединения с мышцей. В процессе эволюции у нервных клеток появился хорошо развитый цитоскелет, необходимый для поддержания столь необычной формы и эффективного транспорта веществ из одного конца клетки в другой. Однако ключевая специализация нервной клетки связана с ее плазматической мембраной, содержащей белки, которые образуют *ионные насосы* и *каналы* и вызывают передвижение ионов, эквивалентное электрическому току. Хотя такие насосы и каналы имеются в плазматической мембране всех клеток, только нервная клетка использует их таким образом, чтобы электрический импульс мог распространиться от одного конца клетки до другого за какую-то долю секунды и передать сигнал к действию.

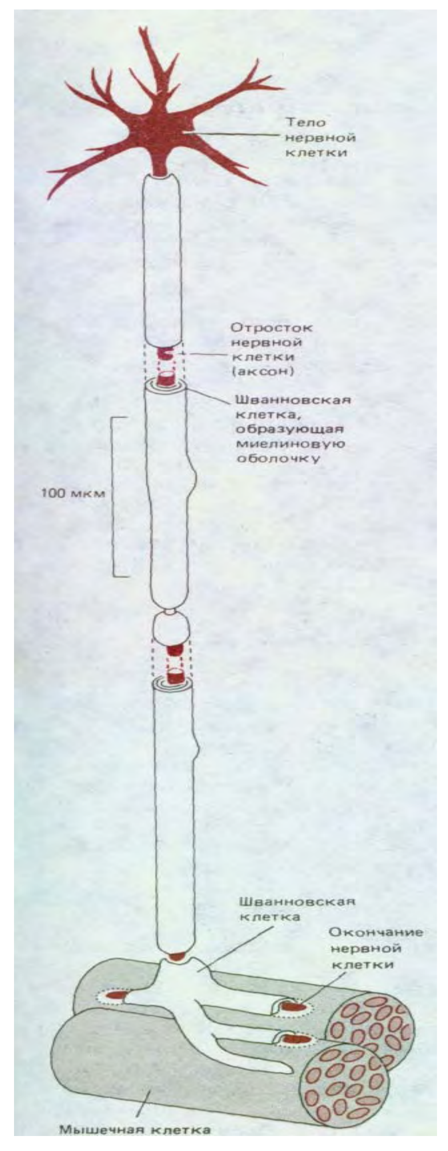


Рис. 1-37. Схематическое изображение нервномышечного соединения: отросток нервной клетки, окруженный миелиновой оболочкой, контактирует с мышечной клеткой.



Рис. 1-38. Микрофотография (сканирующий электронный микроскоп) нейтрофила - одного из представителей лейкоцитов - поглощающего дрожжевую клетку. (Из J. Boyles, D.F. Bainton, Cell, 24, 905-914, 1981. © Cell Press.)

3. Наконец, шванновские клетки специализированы для массового «производства» плазматической мембраны, которую они слой за слоем, как ленту, навивают на вырост нервной клетки так, что получается служащая изолятором миелиновая оболочка.

1.3.10. Клетки иммунной системы специализируются на химическом узнавании

Из всех имеющихся у высших животных клеточных систем две по сложности и тонкости организации достигли высшей степени развития. Это *иммунная система* и *нервная система* позвоночных. Каждая из них далеко превосходит любой искусственный прибор: иммунная система - по способности к химическому распознаванию, а нервная система - по способности к восприятию и управлению. Каждая система состоит из многих различных типов клеток и основана на взаимодействии между ними.

Защищенная от внешних воздействий и тщательно поддерживаемая внутренняя среда многоклеточного организма благоприятна не только для собственных клеток животного - она притягательна также и для посторонних организмов. Следовательно, животным необходимо защитить себя от вторжений, в особенности от вирусов и бактерий. Первоочередная задача **иммунной системы** состоит в уничтожении любых проникнувших в тело животного чужеродных микроорганизмов.

Как указывалось выше, многие эукариотические клетки способны к фагоцитозу: они могут поглощать извне частицы различных веществ и переваривать их. Среди дифференцированных клеток высших животных есть «специалисты» по фагоцитированию, например макрофаги, способные проглатывать и уничтожать бактерии и другие клетки (рис. 1-38). Но тут возникает одно осложнение: хорошо, когда фагоциты атакуют вторгнувшиеся извне клетки, но для организма было бы губительным, если бы они стали нападать также на близких родственников и коллег. Таким образом, иммунная система должна отличать собственные клетки от чужеродных, т.е. уметь распознавать «свое» и «чужое».

Для этой цели у позвоночных развился специальный класс узнающих *клеток - лимфоциты.* Сами по себе лимфоциты не являются фагоцитами, но кооперируются с последними, посылая им сигналы, показывающие, следует ли атаковать данную клетку или оставить ее в живых. В частности, некоторые лимфоциты (В-лимфоциты) вырабатывают специальные белковые *молекулы - антитела,* избирательно связывающиеся с определенными атомными группами на поверхности чужеродных организмов или производимых ими токсичных молекул. Чтобы пометить новый, вторгнувшийся извне организм как чужеродный, должен быть произведен новый класс антител, но, поскольку количество возможных чужеродных организмов очень велико и практически непредсказуемо, В-лимфоциты должны быть способны к синтезу бесконечного разнообразия антител. В то же время иммунная система не должна производить антитела, связывающиеся с собственными молекулами и клетками организма.

Огромное разнообразие антител создается уникальными генетическими механизмами, благодаря их существованию в организме синтезируются миллионы генетически различных лимфоцитов, каждый из них при пролиферации формирует клон, все члены которого вырабатывают одно и то же специфическое антитело. Те клоны из этого множества, которые вырабатывают антитела, реагирующие с собственными молекулами организма, уничтожаются или подавляются (с помощью все еще не ясных механизмов), а те, которые продуцируют антитела против

чужеродных молекул, избирательно выживают и размножаются. Таким образом, развитие иммунной системы индивидуального животного, подобно эволюционному процессу, использует стратегию случайных изменений с последующим отбором.

1.3.11. Нервные клетки позволяют организму быстро адаптироваться в изменяющихся условиях [17, 18]

Наличие иммунной системы - признак, свидетельствующий о высокой организации позвоночных и отличающий их от низших животных, у которых лимфоциты отсутствуют. **Нервная система,** напротив, имеется практически у всех многоклеточных животных. Ее роль состоит в обеспечении еще более фундаментальной потребности - потребности в быстром адаптивном ответе на внешние события.

На протяжении многих поколений эволюция совершенствует структуру организма, доводя ее до оптимальной, и приводит ее в соответствие со средой обитания. Однако в подавляющем большинстве экологических ниш наблюдаются изменения, которые происходят слишком быстро для того, чтобы могла выработаться эволюционная адаптация. В этих условиях наиболее приспособленными окажутся организмы, способные к адаптации иного рода, не требующей генетических мутаций, но тем не менее модифицирующей поведение в соответствии с изменившимися обстоятельствами. Если последовательность изменений окружающей среды полностью предсказуема, наподобие смены дня и ночи или зимы и лета, автономные изменения организма по соответствующему расписанию могут быть генетически запрограммированы. Так, фотосинтезирующая активность принадлежащего к динофлагеллятам одноклеточного организма *Gonyaulax* (рис. 1-39) обнаруживает 24-часовую периодичность, поддерживающуюся, даже если организм в течение недели содержать в условиях постоянного освещения. Такие биологические часы есть и у многих других организмов, но механизм их действия все еще не разгадан.

Однако большинство изменений, происходящих в окружающей среде, не предсказуемы. Например, бактерии, обитающие в кишечнике, подвергаются нерегулярным колебаниям состава и количества доступного для них питания, и любая бактерия, способная подстраивать свой метаболизм к этим изменениям, будет иметь преимущество над бактерией, не способной к такой реакции. Поэтому бактерии приобрели способность регулировать скорость синтеза своих метаболических ферментов в зависимости от концентрации питательных веществ в окружающей среде. Для сопряжения внешнего стимула с адаптивным ответом служат

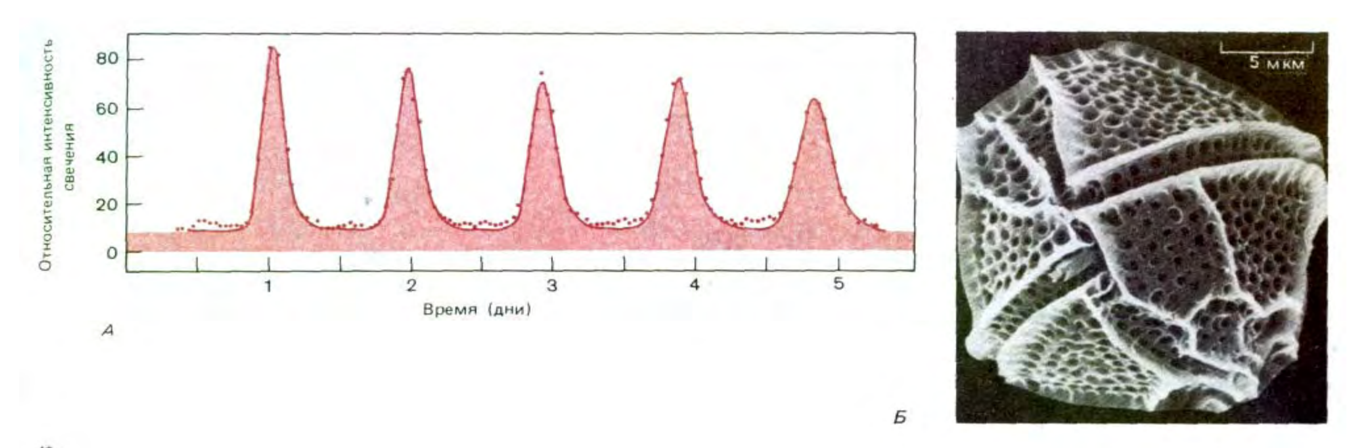


Рис. 1-39. *А.* Ритм свечения фотосинтезирующего простейшего *Gonyaulax polyedra,* соотнесенный с теоретической кривой. Средний период ритма свечения равен 22 ч 58 мин, а отклонение для индивидуальных клеток в популяции составляет в сутки ± 18 мин. *Б.* Микрофотография (сканирующий электронный микроскоп) *Gonyaulax.* (А - из D. Njus, V.D. Gooch, J. W. Hastings, Cell Biophys., 3, 223-231, 1981; *Б - с* любезного разрешения John Dolge.)

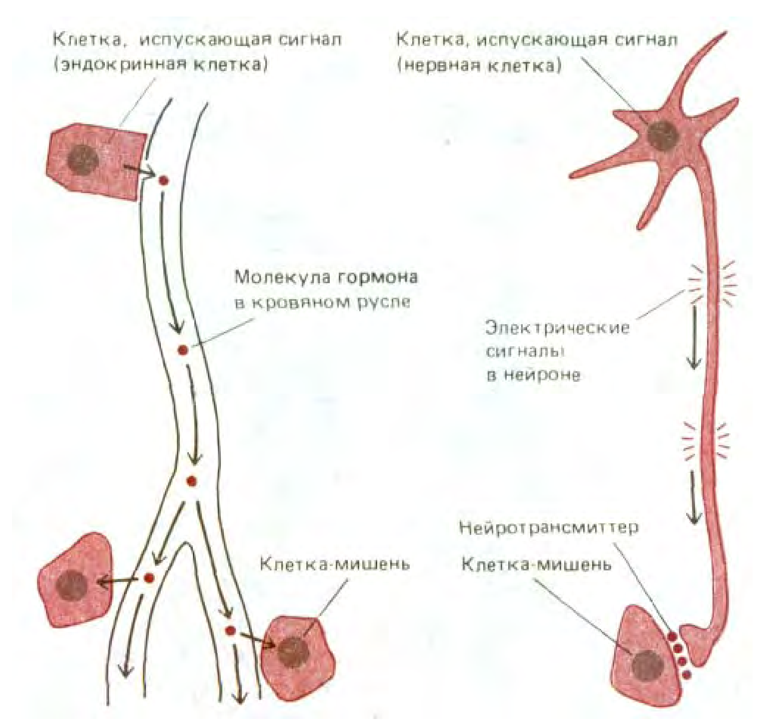


Рис. 1-40. Сравнение гормональной и нервной сигнализации. Эндокринная клетка при стимуляции высвобождает гормоны в кровяное русло, и циркулирующие гормоны вызывают ответ в любой клетке, чувствительной к ним, независимо от того, где она находится. Нервная клетка при стимуляции генерирует потенциал действия, распространяющийся вдоль аксона и быстро запускающий высвобождение нейротрансмиттера с окончания аксона; нейротрансмиттер действует только на клетки, находящиеся в непосредственной близости от окончания аксона.

специальные управляющие молекулы (такие, как *циклический AMP, cAMP)*.

У многоклеточного организма сигнал, связывающий восприятие с действием, должен, как правило, передаваться от одних клеток к другим. Так, подстройка метаболизма часто осуществляется гормонами, которые, будучи секретированы одной группой клеток, путешествуют в тканях и вызывают ответ в других группах клеток. Но гормону требуется много времени, чтобы пройти большое расстояние, кроме того, он при этом диффундирует во все стороны. Чтобы химический сигнал передавался быстро, он должен испускаться вблизи своей мишени, тем же путем достигается точная локализация действия сигнала. Но если химический сигнал должен испускаться вблизи мишени, то как же можно использовать такой способ связи для сопряжения восприятия с реакцией на него в удаленной части организма? Проблему решают нервные клетки. Один их конец чувствителен к химическим или физическим стимулам, а другой - продуцирует химический сигнал - *нейромедиатор,* действующий на другие клетки (рис. 1-40). Стимуляция одного конца клетки вызывает электрическое возбуждение, которое быстро распространяется до другого конца, где вызывает высвобождение нейромедиатора. Такое сигнальное устройство позволяет многоклеточным животным быстро реагировать на изменчивый окружающий мир, а также точно координировать активность далеко отстоящих друг от друга частей тела.

1.3.12. Связи между нервными клетками определяют тип поведения

Одиночный нейрон человека не очень отличается от одиночного нейрона червя. Преимущество нервной системы человека основано на огромном количестве входящих в нее клеток и, самое главное, на способе их соединения друг с другом, который и определяет возможности нейронов в передаче, комбинировании и интерпретации сенсорных сигналов, а также в координации сложных последовательностей действий. Чтобы понять клеточные основы эволюции нервной системы, необходимо рассмотреть механизмы, с помощью которых эмбриональные нервные

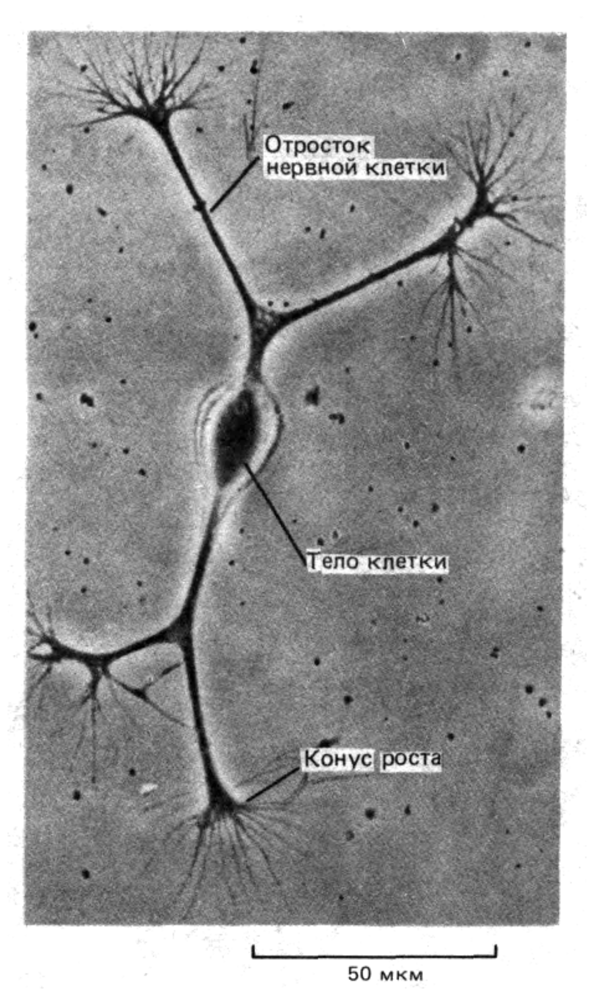


Рис. 1-41. Микрофотография изолированной нервной клетки куриного эмбриона, помещенной в культуральный сосуд с питательным раствором. У клетки появляются длинные выросты, каждый из которых продвигается с помощью структуры, называемой конусом роста. (С любезного разрешения Zoltan Gabor.)

клетки приобретают фантастически сложные формы и достигают строго упорядоченного способа их соединения (рис. 1-41). Некоторое представление об изумительной сложности и организованности сетей, которые сплетают развивающиеся нервные клетки, дает зрительная система мухи (рис. 1-42). Строение всей этой структуры задано генетически, и развитие ее происходит нормально даже в отсутствие света. При анализе развития нервной системы обнаруживается, что у всех видов оно основано на одних и тех же фундаментальных принципах: одинаковые механизмы используются для клеточного движения, межклеточной адгезии, химической сигнализации и т.д. Эволюция сложной нервной системы основывается прежде всего на эволюции сложных контрольных механизмов сочетания и координирования этих главных типов клеточного поведения.

Характер связей между нервными клетками определяет поведение животного. Без всякого обучения и опыта самец мухи спаривается с самкой, паук плетет свою паутину, птицы летят на юг. Все эти действия предначертаны в ДНК этих видов, которая контролирует поведение отдельных клеток при построении нервной системы у эмбриона и работу нервной системы у взрослого организма.

Но не всякое поведение генетически детерминировано, важное значение имеет и собственный опыт животного. Лишение развивающегося млекопитающего сенсорных стимулов может изменить микроструктуру

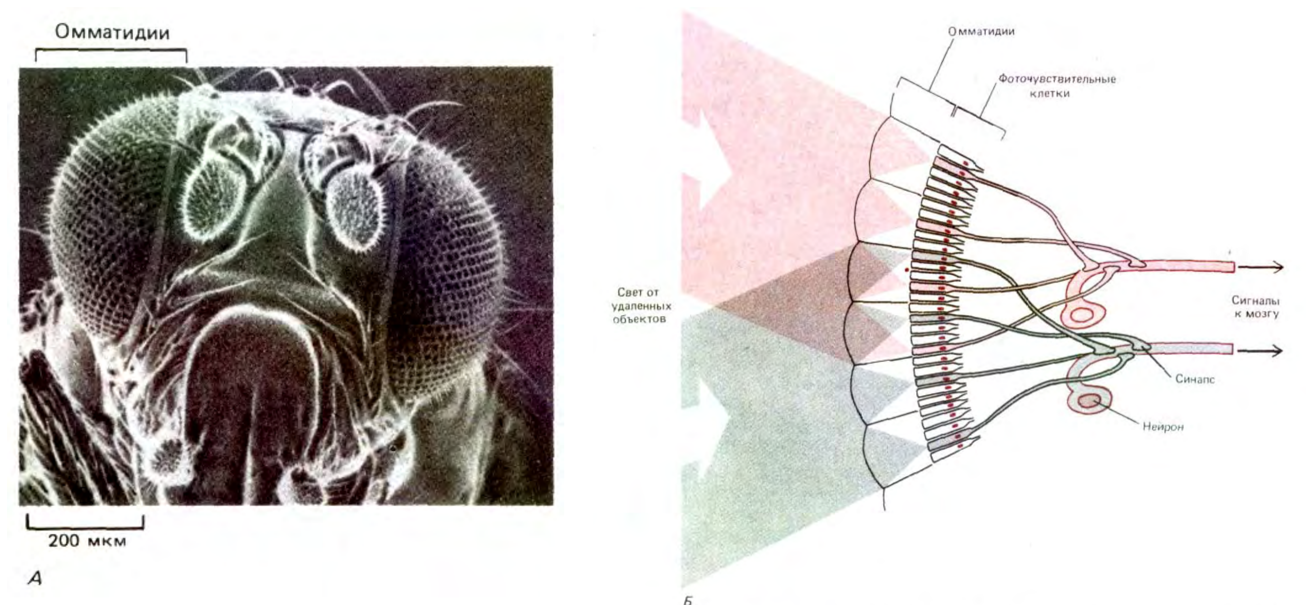
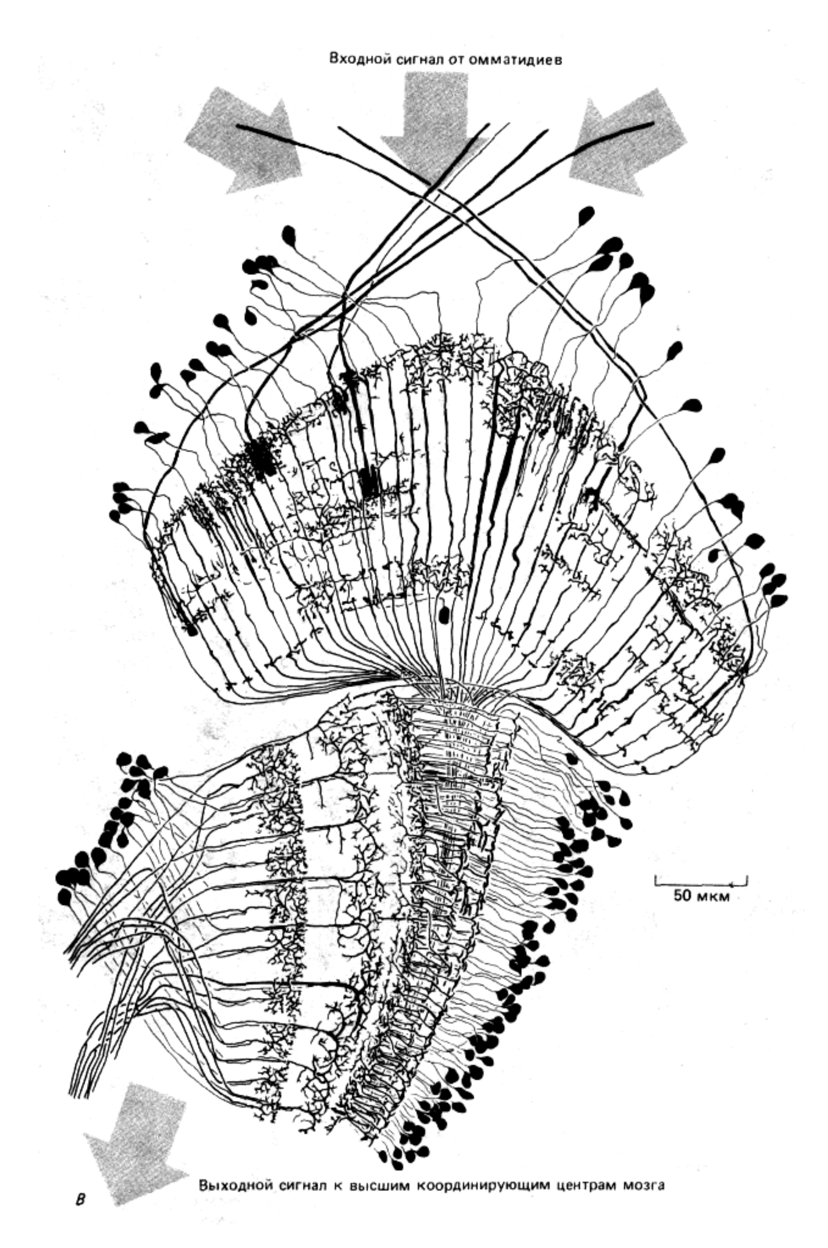


Рис. 1-42. *А.* Вид в сканирующем электронном микроскопе головы плодовой мушки *(Drosophila). С* двух сторон головы расположены два больших сложных глаза, состоящие из множества элементов, называемых *омматидиями.* Каждый омматидий имеет свою линзочку, фокусирующую свет на группу находящихся в его основании клеток-фоторецепторов. *Б.* Схематическое изображение нейронных связей в наружном слое глаза мухи, видимых на вертикальном срезе. Свет проникает в каждый омматидий сложного глаза и фокусируется на одну из восьми находящихся в основании омматидия фоточувствительных клеток-рецепторов (здесь показаны лишь пять из них). Из-за кривизны сложного глаза свет от удаленного точечного источника фокусируется в разных омматидиях на разные фоточувствительные рецепторы. Однако короткие аксоны фоторецепторов, «смотрящих» на одну и ту же точку, переплетены таким образом, что оказываются подсоединенными к одному и тому же идущему в мозг насекомого пучку аксонов. В каждом глазу мухи присутствует более тысячи таких аксонных пучков, причем каждый из них в ходе индивидуального развития точно присоединяется к правильному набору фоторецепторов. *В.* Сеть нервных клеток участка мозга мухи, получающего и обрабатывающего входной сигнал от омматидиев. *(А - с* любезного разрешения Rudi Turner and Antony Mahowald; *В* - из N. Stausfeld, Atlas of an Insect Brain. New York, Springer, 1976.)

мозга. Взрослые животные почти всех видов - от кишечнополостных до человека - в той или иной степени способны к обучению. По определению обучение - это результат опыта и, следовательно, электрической активности нервных клеток, которая должна приводить к длительным изменениям нейронных связей. Детальная расшифровка этих механизмов является одной из центральных задач современных нейробиологических исследований.

Многие нейронные связи мозга, позволяющие нам читать, писать и говорить, появляются в результате обучения и отражают негенетический тип наследования. Обучение и обмен информацией дали возмож-



ность человеку как виду адаптироваться таким способом, который для менее высокоорганизованных существ возможен только лишь путем генетической эволюции. Тем не менее ясно, что даже эти очень сложные способности, лежащие в основе нашей культуры и общества, имеют в своей основе тонкие особенности поведения клеток - правила, по которым нейроны на долгое время модифицируют свои связи в результате электрической активности.

Конечно, изучая лишь единичные клетки, мы не поймем, как устроен многоклеточный организм, точно так же, как мы не поймем устройства клетки, анализируя отдельные биологические молекулы. Но все же, не

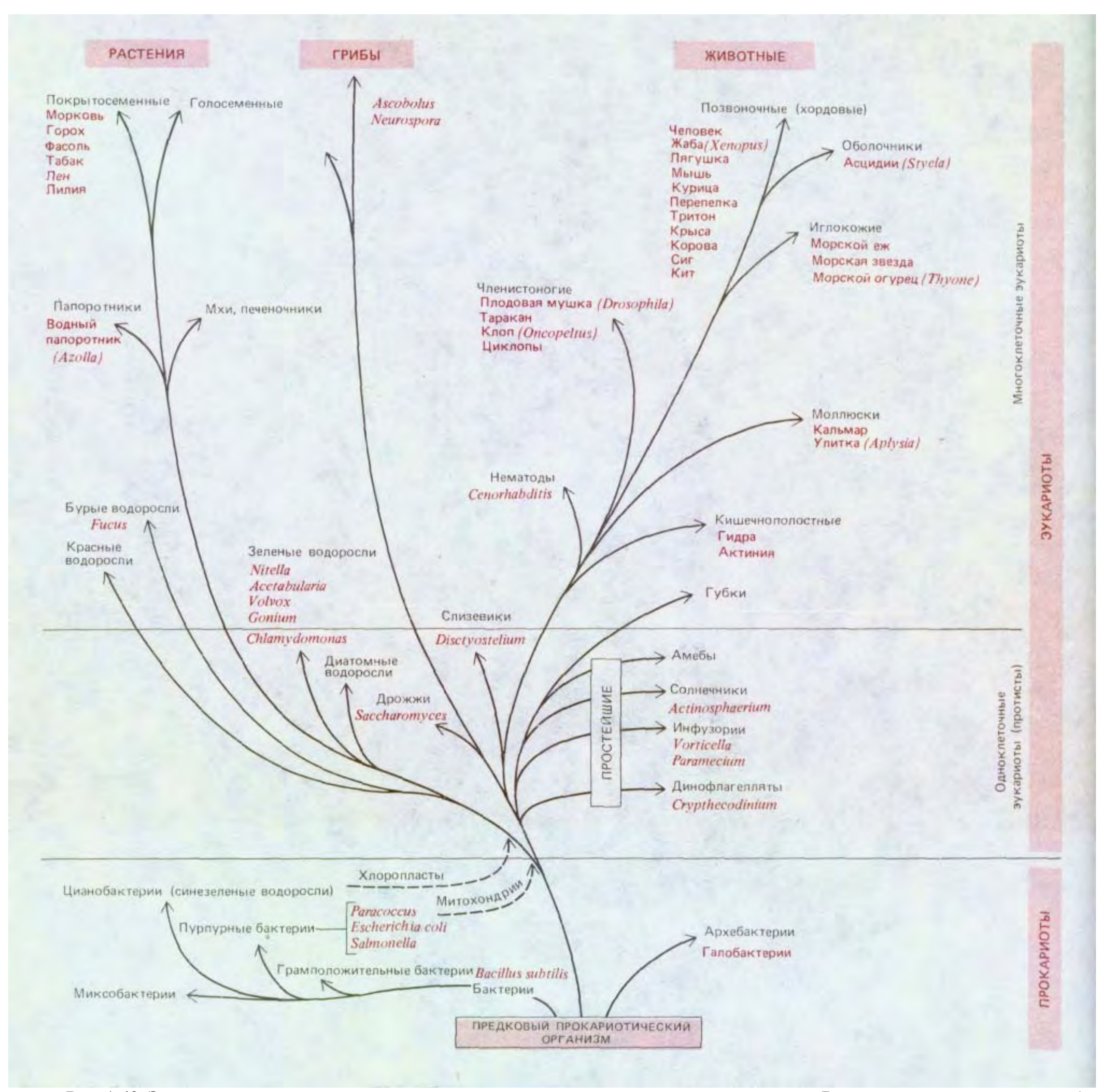


Рис. 1-43. Эволюционное родство между некоторыми упомянутыми в этой книге организмами. Ветви древа показывают пути общего происхождения, но их длина не отражает реального временного масштаба. (Отметим также, что вертикальная ось диаграммы демонстрирует не время, а основные категории организмов.)

зная строения клетки, мы не можем рассчитывать на полное понимание работы организма. И мы не можем как следует разобраться в механизмах функционирования клетки, не зная составляющих ее молекул. Таким образом, обсуждение живой клетки, к которому мы переходим в следующей главе, должно начинаться с описания входящих в ее состав молекул.

Заключение

Эволюция крупных многоклеточных организмов связана со способностью эукариотических клеток по-разному экспрессировать наследственную информацию, а также с умением этих клеток функционировать сообща. Одним из наиболее ранних этапов на пути к многоклеточности было

появление эпителия, в котором клетки соединены в слои, отделяющие внутреннюю среду организма от внешнего окружения. Первыми примитивными типами дифференцированных клеток должны были быть наряду с эпителиальными клетками нервные клетки, мышечные клетки и клетки соединительной ткани. Все эти типы клеток можно найти даже у очень примитивных современных животных.

Эволюция высших животных, используя ту же основную стратегию развития, шла в направлении создания все возрастающего числа специализированных клеточных типов и все более утонченных методов координации их активности (рис. 1-43). Две системы клеток высших животных представляют каждая в своем роде вершину сложности многоклеточной организации. Одна - это иммунная система позвоночных, клетки которой способны производить миллионы различных антител. Другая - это нервная система. У низших животных большая часть нейронных связей жестко генетически детерминирована, и программа поведения эволюционирует лишь благодаря мутациям генетического материала. У высших животных работа и структура нервной системы становились все более подверженными модификациям (обучению) благодаря способности нервных клеток изменять свои связи в ответ на вызванную внешними стимулами электрическую активность.

Литература

Общая

Bendall D. S. ed. Evolution from Molecules to Men. Cambridge, UK. Cambridge
University Press, 1983.

Curtis H. Biology, 4th ed. New York. Worth, 1983.

Darnell J. E., Lodish H. F., Baltimore D. Molecular Cell Biology, Chapter 25.

New York. W.H. Freeman, 1986. *Darwin C.* On the Origin of Species. London. Murray, 1859. Reprinted, New York, Penguin, 1984. Evolution. Sci. Am. 239(3), 1978. (An entire issue devoted to the topic.)

Keeton W. T., Gould J. W., Gould C. G. Biological Science, 4th ed. New York, Norton, 1986.

Maynard Smith J. The Theory of Evolution, 3rd ed. New York, Penguin, 1975.

Watson J. D., Hopkins N. H., Roberts J. W., Steitz J. A., Weiner A. M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed. Chapter 28. Menlo Park CA. Benjamin-Cummings, 1987.

Wilson E. B. The Cell in Development and Heredity, 3rd ed. New York: Macmillan, 1925. (Reprinted, New York: Garland, 1987.)

Цитируемая

1. *Ferris J.P., Usher D.A.* Origins of life. In: Biochemistry, 2nd ed. (G. Zubay ed.), pp. 1120-1151. New York: Macmillan, 1988.
   Miller S. M., Orgel L. E. The Origins of Life on the Earth. Englewood Clifis, NJ. Prentice-Hall. 1974.
   Schopf J. W., Hayes J. M., Walter M. R. Evolution of earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In: Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution (J. W. Schopf ed.), pp. 361-384. Princeton, NJ. Princeton University Press, 1983.
2. *Eigen M., Gardiner W., Schuster P., Winkler-Oswatitsch R.* The origin of genetic information. Sci. Am., 244(4), 88-118, 1981.
3. *Cech T.R.* RNA as an enzyme. Sci. Am. **255(5),** 64-75, 1986.
4. *Alberts B. M.* The function of the hereditary materials: biological catalyses reflect the cell's evolutionary history. Am. Zool. **26**, 781 - 796, 1986.
   Darnell J. E., Doolittle W. F. Speculations on the early course of evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1271 - 1275, 1986.
   Orgel L.E. RNA catalysis and the origin of life. J. Theor. Biol. **123**, 127-149, 1986.
5. *Rogers M. et al.* Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 1160-1164, 1985.
6. *Vidal G.* The oldest eukaryotic cells. Sci. Am., **250(2)**, 48-57, 1984.
7. *Clarke P. H.* Enzymes in bacterial populations. In: Biochemical Evolution (H. Gutfreund ed.), pp. 116-149. Cambridge UK. Cambridge University Press, 1981.

Doolittle W.F. Archaebacteria coming of age. Trends Genet., **1**, 268-269, 1985.
Woese C. R. Bacterial evolution. Microbiol. Rev**., 5**, 221-271, 1987.
8. *Wilson A.* The molecular basis of evolution. Sci. Am., **253(4),** 164-173, 1985.
9. *Dickerson R. E.* Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. Sci. Am., **242(3)**, 136-153, 1980.
10. *Cavalier-Smith T.* The origin of eukaryotic and archaebacterial cells. Ann.N.Y. Acad. Sci. 503, 17-54, 1987.
Margulis L. Symbiosis in Cell Evolution. New York, W. H. Freeman, 1981.
11. *Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedman S.,* Debrunner-Vossbrinck B. A., Woese C. R., Ribosomal RNA sequence suggest microsporidia are extremely ancient eukarvotes. Nature, **326**, 411-414, 1987.
Yang D., Oyaizu Y., Oyaizu H., Olsen G. J., Woese C. R. Mitochondrial origins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 4443-4447. 1985.
12. *Sleigh M. A.* The Biology of Protozoa. London, Edward Arnold, 1973.
Sogin M. I., Elwood H. J., Gunderson J. H. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 1383-1387, 1986.
13. *Buchsbaum R.* Animals Without Backbones, 2nd ed. Chicago. University of Chicago Press, 1976.
Field K. G. et al. Molecular phytogeny of the animal kingdom. Science, **239**, 748-753, 1988.
Margulis L., Schwartz K. V. Five Kingdoms: An illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, 2nd ed. New York. W.H. Freeman, 1987.
Shapiro J. A. Bacteria as multicellular organisms. Sci. Am**., 258(6),** 82-89, 1988.
Valentine J. W. The evolution of multicellular plants and animals. Sci. Am., **239(3),** 140-158, 1978.
14. *Bode P. M., Bode H. R.* Patterning in Hydra. In: Pattern Formation (G. M. Malacinski, S.V. Bryant eds.), pp. 213-244. New York, Macmillan, 1984.
15. *Raff R. A., Kaufman T. C.* Embryos, Genes, and Evolution. New York. Macmillan, 1983.
16. *Maynard Smith J.* The Evolution of Sex. Cambridge, UK. Cambridge University Press, 1978.
Michod R. E., Levin B. R. eds. The Evolution of Sex: An Examination of Current Ideas. Sunderland, MA. Sinauer, 1988.
17. *Winfree A. T.* The Timing of Biological Clocks. New York. W. H. Freeman, 1987.
18. *Bullock T. H., Orkand R., Grinnell A.* Introduction to Nervous Systems. San Francisco. Freeman, 1977.

2. Малые молекулы, энергия и биосинтез

«Хочу сообщить, что я научился получать мочевину, не используя для этого изолированную почку или животное, будь то человек или собака». Эти слова, написанные 150 лет назад молодым немецким химиком Вёлером (Wohler), ознаменовали собой конец веры в особую жизненную силу (vital force), присущую живым организмам и обусловливающую характер их отличительных особенностей. Однако то, что было откровением во времена Вёлера, сегодня звучит вполне обыденно - живые существа состоят из химических соединений. В современном представлении о жизни нет места ни для витализма, ни для чего бы то ни было, выходящего за рамки законов химии и физики. Из этого отнюдь не следует, что в биологии не осталось тайн: как покажут следующие главы, в ней еще много «белых пятен». Тем не менее следует сразу же подчеркнуть, что объем накопленных знаний поистине колоссален.

Сейчас мы располагаем подробными сведениями о важнейших молекулах клетки, причем не о каком-то небольшом их числе, а почти обо всех. Во многих случаях нам точно известна их химическая структура, так же как и пути их образования и распада. В общих чертах мы представляем себе, как химическая энергия поддерживает процессы биосинтеза в клетке, как на основе законов термодинамики создается молекулярная упорядоченность и как регулируются и координируются мириады непрерывно протекающих внутри клетки химических превращений.

В этой и следующей главах мы познакомимся вкратце с химическими свойствами живой клетки. Здесь будут рассматриваться процессы, протекающие с участием малых молекул: механизмы, с помощью которых клетка синтезирует свои главные химические компоненты и получает необходимую энергию. В гл. 3 речь пойдет о гигантских молекулах (полимерах), чьи свойства определяют специфичность биологических процессов и передачу биологической информации.

2.1. Химические компоненты клетки

2.1.1. Основа клеточной химии - соединения углерода [1]

Живая клетка состоит из ограниченного набора элементов, причем на долю шести из них (C, H, N, O, P, S) приходится более 99% ее общей массы. Такой состав, заметно отличающийся от состава земной коры, свидетельствует о химизме особого типа (рис. 2-1). В чем же своеобразие химии живого и как оно возникло в процессе эволюции?

Соединение, которое живая клетка содержит в наибольшем количестве, - это вода. Она составляет около 70% массы клетки, и большинство внутриклеточных реакций протекает в водной среде. Жизнь на нашей планете возникла в океане, и условия этой первобытной среды наложили неизгладимый отпечаток на химию живых существ. «Конструкция» всех живых организмов связана с уникальными свойствами

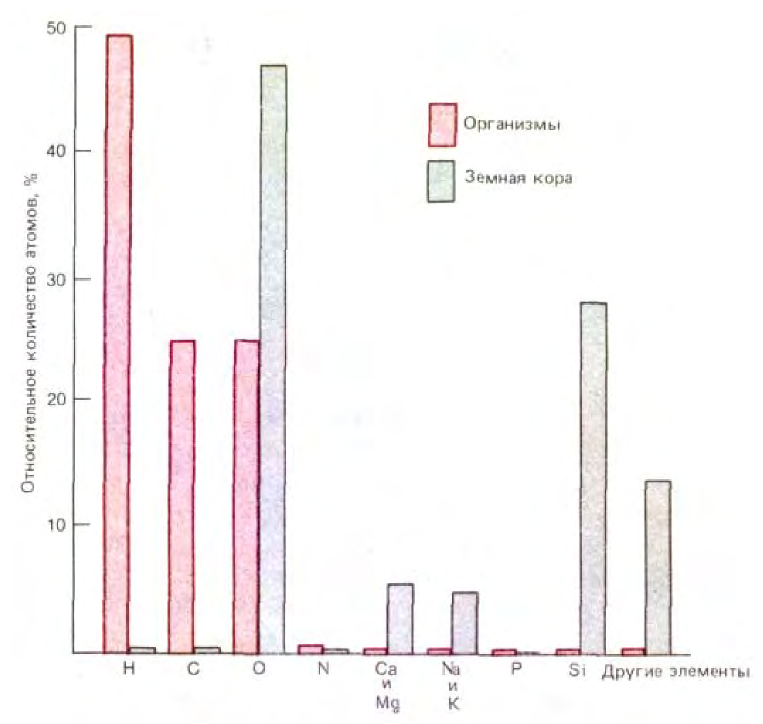


Рис. 2-1. Относительное количество химических элементов, обнаруженных в земной коре (неживой мир), по сравнению с количеством тех же элементов в мягких тканях живых организмов. Относительное количество выражено в процентах к общему *числу* имеющихся атомов. Так, например, на долю водорода приходится около 50% от числа всех атомов, присутствующих в живых организмах.

воды, такими, как полярный характер ее молекул, способность к образованию полярных связей и большое поверхностное натяжение (схема 2-1).

Если не считать воды, можно сказать, что почти все молекулы клетки, за небольшим исключением, относятся к соединениям углерода, которые рассматриваются в курсе **органической химии.** Среди всех элементов Земли углерод занимает особое место по способности к образованию больших молекул; до некоторой степени аналогичной способностью обладает кремний, однако он сильно уступает углероду в этом отношении. Благодаря малому размеру и наличию на внешней оболочке четырех электронов атом углерода может образовать четыре прочные ковалентные связи с другими атомами. Наиболее важное значение имеет способность атомов углерода соединяться друг с другом. образуя цепи и кольца и создавая в результате большие и сложные молекулы, на размеры которых не накладывается никаких видимых ограничений. Другие атомы, широко представленные в клетке (H, N и O), имеют, как и углерод, небольшие размеры и способны образовать очень прочные ковалентные связи (схема 2-2).

В принципе простые правила образования ковалентной связи между углеродом и другими элементами допускают существование астрономически большого числа соединений. Количество различных углеродных соединений в клетке действительно очень велико, но это лишь крошечная часть теоретически возможного. В некоторых случаях мы можем довольно убедительно обосновать, почему то или иное соединение выполняет именно данную биологическую функцию; однако чаще возникает ощущение, что выбор пал на один из многих приемлемых вариантов и свою роль здесь сыграл случай (рис. 2-2). Определенные типы реакций и химические мотивы, однажды установившись, сохранили (с некоторыми вариациями) свой характер в ходе эволюции. Появление новых классов соединений было, очевидно, необходимым или целесообразным лишь в редких случаях.

2.1.2. Клетки используют четыре основных типа молекул [2]

Определенные простые комбинации атомов, такие, как метальные (—CH_3), гидроксильные (—OH), карбоксильные (—COOH) группы и аминогруппы (—NH_2), неоднократно повторяются в биологических молекулах. Каждая такая группа обладает определенными химическими и физическими свойствами, которые оказывают влияние на поведение любых молекул, содержащих такие группы. Общие сведения об основных типах химических групп и их отдельных характерных свойствах приведены на схеме 2-2.

Так называемые **малые органические молекулы** клетки представляют собой соединения углерода с мол. массой от 100 до 1000, содержащие до 30 атомов углерода. Молекулы такого рода обычно находятся в свободном состоянии в цитоплазматическом растворе, образуя пул промежуточных продуктов, дающих начало крупным молекулам, называемым *макромолекулами.* Они служат также важнейшими промежуточными продуктами в химических реакциях, преобразующих извлеченную из пищи энергию в пригодную для использования форму (см. ниже).

На долю малых молекул приходится около одной десятой всего клеточного органического вещества, причем в клетке присутствует (по приближенным оценкам) около тысячи различных видов таких молекул. Расщепляясь, все биологические молекулы распадаются до тех простых соединений, из которых они и синтезируются, причем синтез и распад происходят в результате ограниченного количества химических превращений, которые подчиняются определенным правилам. Следовательно, все имеющиеся в клетке соединения можно разбить на небольшое число отдельных семейств. Крупные макромолекулы (они рассматриваются в гл. 3) строятся из малых молекул и относятся, таким образом, к тем же семействам.

Вообще говоря, содержащиеся в клетках малые органические молекулы образуют четыре семейства: простые **сахара, жирные кислоты, аминокислоты и нуклеотиды.** В состав каждого из этих семейств входит много различных соединений, имеющих общие химические свойства. Хотя некоторые соединения клетки не попадают в эти категории, на упомянутые четыре семейства, включающие как малые молекулы, так и построенные из них макромолекулы, приходится удивительно большая часть клеточной массы (табл. 2-1).

2.1.3. Сахара как пища для клеток [3]

Сахара простейшего типа **- моносахариды -** представляют собой соединения с общей формулой $(CH_2O)n$, где n - любое целое число от трех до семи. *Глюкоза,* например, имеет формулу $C_6H_{12}O_6$ (рис. 2-3). Как показано на рис. 2-3, сахара могут существовать либо в форме кольца, либо в виде открытой цепи. Сахара, имеющие структуру открытой цепи, содержат гидроксильные группы и, кроме того, либо альдегидную группу, либо кетогруппу. Альдегидная группа и кетогруппа играют особую роль. Во-первых, они могут вступить в реакцию с гидроксильной группой той же молекулы, что приводит к переходу последней в форму кольца. Углеродный атом исходной альдегидной или кетогруппы можно узнать по тому признаку, что это единственный в молекуле атом углерода, связанный с двумя атомами кислорода. Во-вторых, после образования кольца к этому углеродному атому может присоединиться один из атомов углерода гидроксильной группы молекулы *другого* сахара, в результате чего образуется *дисахарид* (схема 2-3). Присоеди-

ГИДРОФИЛЬНЫЕ И ГИДРОФОБНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

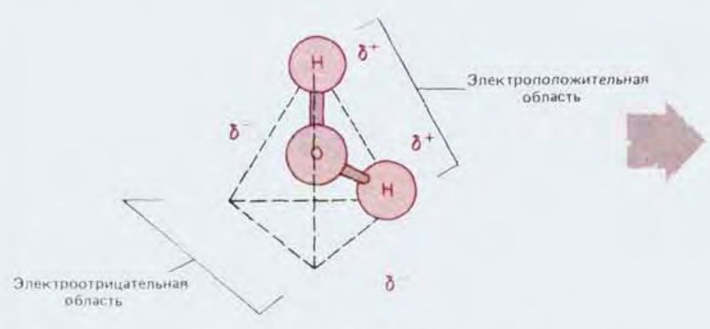
Поскольку молекулы воды полярны, они будут группироваться вокруг ионов или других полярных молекул

Неполярные молекулы разрушают структуру воды, образованную Н-связями. Эти молекулы, следовательно, гидрофобны и совершенно не растворяются в воде

Поэтому соединения, участвующие в образовании структур, стабилизированных водородными связями воды, гидрофильны и достаточно хорошо растворяются в воде

ВОДА

Несмотря на то что в целом молекула воды электронейтральна (имеет равное число электронов и протонов), электроны распределены несимметрично, что придает молекуле воды полярный характер





Ядро атома кислорода в некоторой степени оттягивает электроны от ядер атомов водорода, оставляя на них небольшой суммарный положительный заряд. Области с небольшим отрицательным зарядом располагаются вблизи атома кислорода в двух других углах воображаемого тетраэдра

СТРУКТУРА ВОДЫ

Молекулы воды объединяются водородными связями в пространственную решетку. Даже при 37° С 15% молекул воды образуют короткоживущие агрегаты, в которых каждая из этих молекул соединена с четырьмя другими; такие группы называются "мерцающими кластерами"

Когезивная природа воды обусловливает многие из ее необычных свойств, например высокое поверхностное натяжение, удельную теплоемкость и теплоту испарения

ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

Благодаря поляризации две соседние молекулы H_2O могут образовать так называемую водородную связь. Водородные связи почти в 20 раз слабее ковалентных

Водородные связи имеют наибольшую прочность в том случае, когда 3 атома лежат на одной прямой

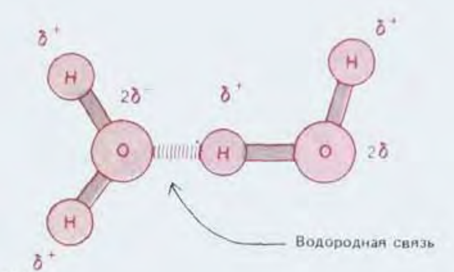
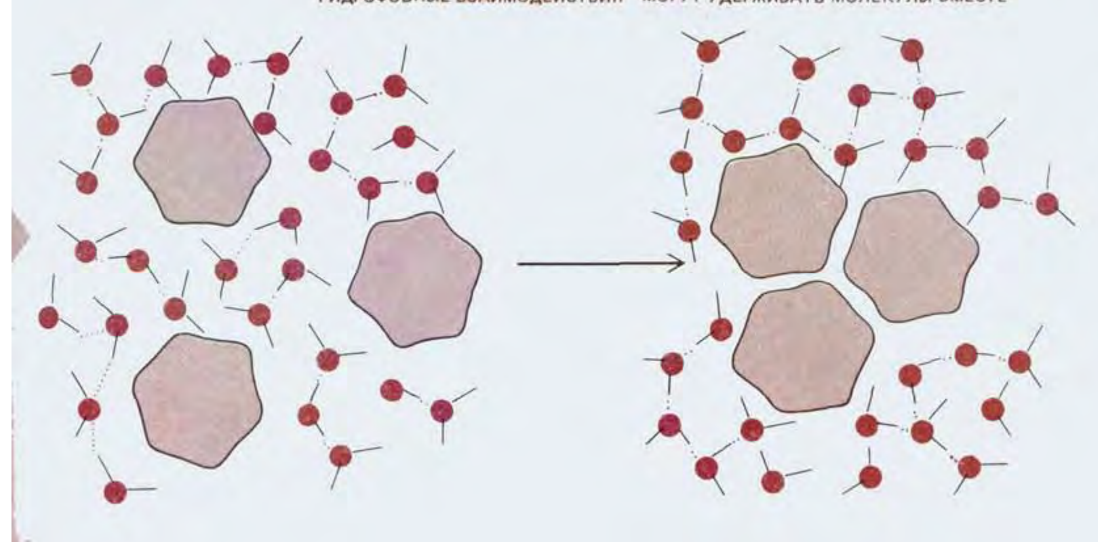


Схема 2-1. Химические свойства воды и их влияние на поведение биологических молекул.

Схема 2-1. Химические свойства воды и их влияние на поведение биологических молекул.

ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОГУТ УДЕРЖИВАТЬ МОЛЕКУЛЫ ВМЕСТЕ



Две (или более) гидрофобные группы, окруженные водой, стремятся сблизиться, поскольку вследствие этого в меньшей степени нарушается структура воды, стабилизированная водородными связями

КИСЛОТЫ И ОСНОВАНИЯ

Кислота – это соединение, которое в растворе отдает ион H^+ (протон), например

$$CH_3-C(=O)OH \rightleftharpoons CH_3-C(=O)O^- + H^+$$

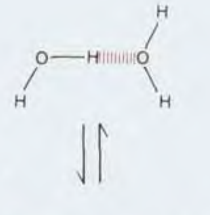
кислота — основание — протон

Основание – это соединение, которое в растворе присоединяет ион H^+ (протон), например,

$$CH_3-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons CH_3-NH_3^+$$

основание — протон — кислота

Вода сама по себе обладает слабо выраженной тенденцией к ионизации, являясь одновременно и кислотой, и основанием



$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$



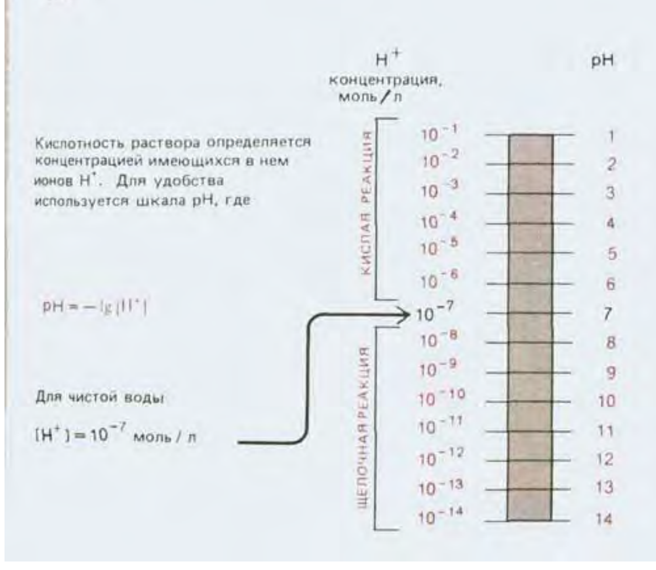
pH

Кислотность раствора определяется концентрацией имеющихся в нем ионов H^+. Для удобства используется шкала pH, где

$$pH = -\lg[H^+]$$

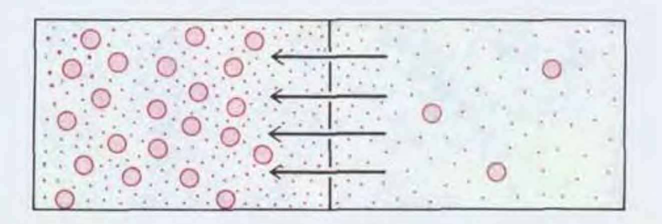
Для чистой воды

$[H^+] = 10^{-7}$ моль / л



ОСМОС

Если два водных раствора разделены мембраной, которая пропускает лишь молекулы воды, вода будет переходить в более концентрированный раствор в результате процесса, называемого осмосом



Это движение воды из гипотонического в гипертонический раствор приводит к повышению гидростатического давления. Два раствора, находящиеся в осмотическом равновесии, называются изотоническими

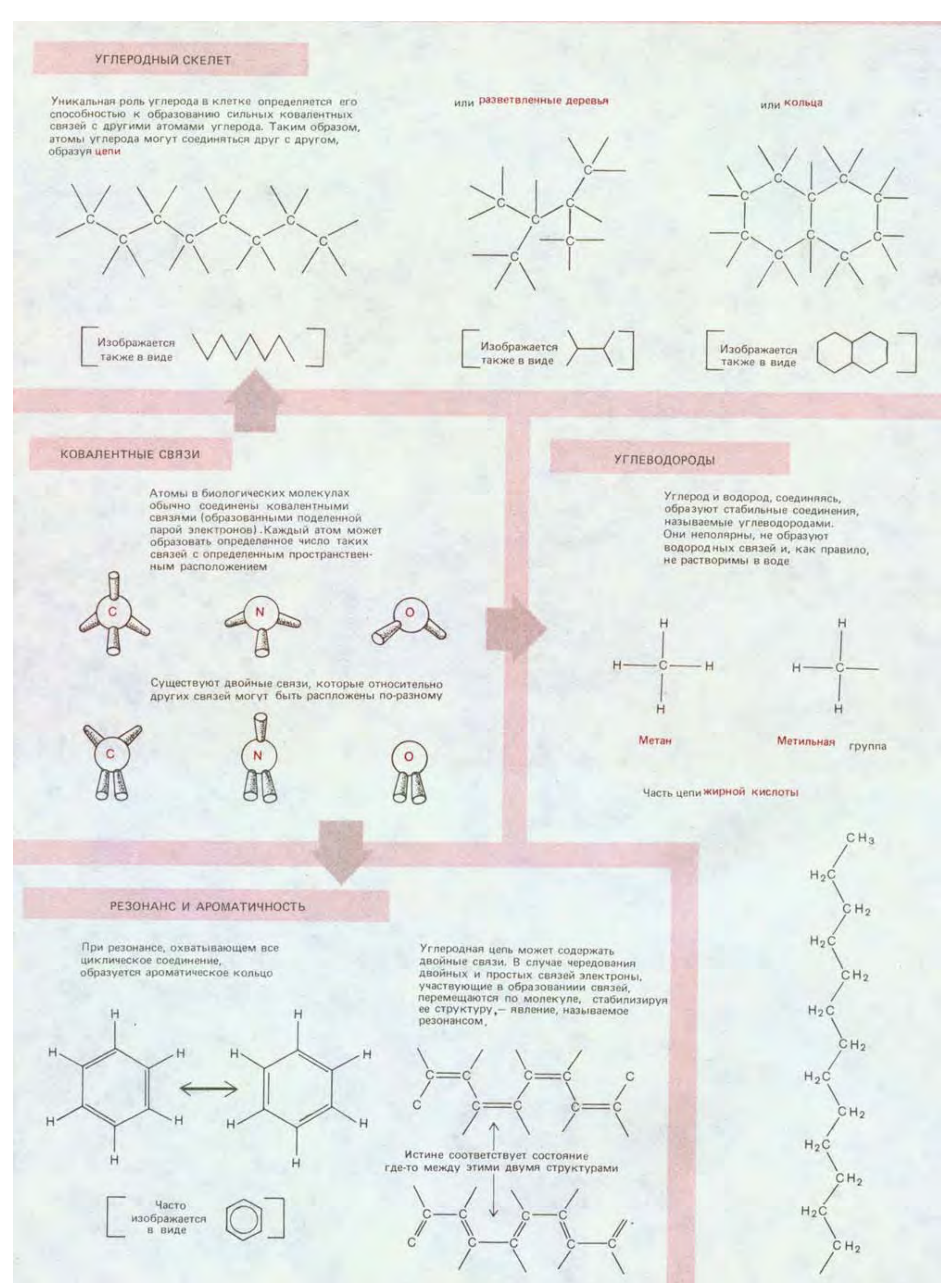


Схема 2-2. Ковалентные связи и группы, встречающиеся в биологических молекулах.

С–О-СОЕДИНЕНИЯ

Многие биологические соединения содержат углерод, связанный с кислородом, например:

спирт

–OH называется гидроксильной группой.

альдегид

кетон

C=O называется карбонильной группой

карбоновая кислота

–COOH называется карбоксильной группой. В воде она теряет ион H^+ и превращается в $-COO^-$

эфиры

Эфиры (сложные) образуются в результате реакции кислоты со спиртом.

$+ H_2O$

С – N-СОЕДИНЕНИЯ

Амины и амиды – два важных примера соединений, содержащих углерод, связанный с атомом азота

Амины в воде присоединяют ион H^+, приобретая положительный заряд

Поэтому они являются основаниями

Амиды образуются в результате реакции кислоты с амином. Они более стабильны, чем эфиры. В отличие от аминов они не несут заряда в воде. Примером служит пептидная связь:

$+ H_2O$

Азот входит также в состав некоторых циклических соединений:

в пуриновые и пиримидиновые основания

Цитозин (пиримидиновое основание)

ФОСФАТЫ

Неорганический фосфат представляет собой стабильный ион, образовавшийся из фосфорной кислоты H_3PO_4. Он часто обозначается в виде (P) или P_i

Фосфорные эфиры могут быть образованы соединением фосфата со свободной гидроксильной группой

$+ H_2O$

Часто изображается в виде

Реакция соединения фосфата и карбоксильной группы либо двух или более фосфатных групп дает кислый ангидрид

$+ H_2O$

Часто изображается в виде

$+ H_2O$

Часто изображается в виде

Эти реакции легко обратимы, поскольку гидролиз кислых ангидридов энергетически очень выгоден

Рис. 2-2. Живые организмы синтезируют лишь небольшую часть органических молекул из всех тех, которые они в принципе могли бы образовать. Из шести изображенных на рисунке аминокислот в клетках синтезируется только самая верхняя - триптофан.

Таблица 2-1. Примерный химический состав бактериальной клетки

	Доля от общей массы клетки, %	**Число типов молекул**
Вода	70	1
Неорганические ионы	1	20
Сахара и их предшественники	1	250
Аминокислоты и их предшественники	0,4	100
Нуклеотиды и их предшественники	0,4	100
Жирные кислоты и их предшественники	1	50
Другие малые молекулы	0,2	~300
Макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды)	26	~3000

нение аналогичным путем большего числа моносахаридов приводит к образованию **олигосахаридов** все возрастающей длины (трисахаридов, тетрасахаридов и т. д.) вплоть до очень больших молекул **полисахаридов,** содержащих тысячи моносахаридных остатков. Поскольку у каждого моносахарида имеется несколько свободных гидроксильных групп, способных образовать связь с другим моносахаридом или каким-либо иным соединением, число возможных структур полисахаридов исключительно велико. Даже простой дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы, может существовать в 11 разновидностях (рис. 2-4), а три различные гексозы ($C_6H_{12}O_6$), соединяясь между собой, способны образовать несколько тысяч различных трисахаридов. Поэтому определение структуры любого конкретного полисахарида - дело исключительно сложное; определение имеющимися методами расположения полудюжины связанных Сахаров (например, в гликопротеине) занимает больше времени, чем выяснение нуклеотидной последовательности молекулы ДНК, состоящей из многих тысяч нуклеотидов.

Глюкоза служит главным источником энергии во многих клетках. В результате последовательного ряда реакций окисления (разд. 2.3.2) эта гексоза превращается в различные производные Сахаров с меньшей длиной цепи и в конечном итоге распадается до CO_2 и H_2O. Суммарное

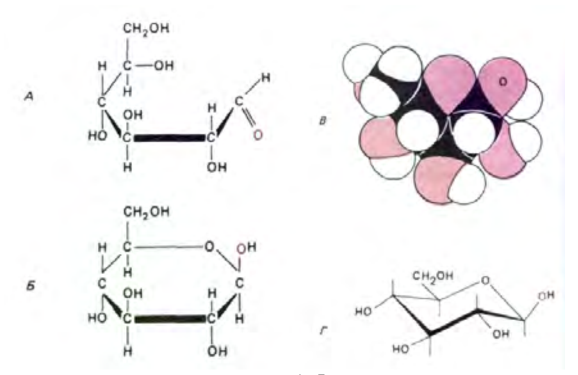


Рис. 2-3. Строение моносахарида глюкозы, простого сахара - гексозы. *А.* Форма открытой цепи находится в равновесии (в растворе) с более стабильной циклической структурой, представленной ниже *(Б). В.* Пространственная модель циклической структуры (р-D-глюкоза). Еще один из возможных вариантов изображения циклической структуры-конфигурация кресла *(Г);* широкое использование такого представления обусловлено тем, что оно наиболее точно отражает структуру сахара. На всех четырех изображениях цветной буквой O обозначен атом кислорода альдегидной группы. Структура и химизм Сахаров представлены на схеме 2-3.

Гексозы $n = 6$

Две наиболее распространенные гексозы – это

глюкоза · фруктоза

Моносахариды

Моносахариды бывают альдегидами или кетонами

которые имеют еще две или более гидроксильные группы. Их общая формула $(CH_2O)_n$. Простейшие моносахариды – это триозы ($n = 3$), например:

глицеральдегид (альдоза)

дигидроксиацетон (кетоза)

Пентозы $n = 5$

Часто встречающаяся пентоза

Рибоза

D-глюкоза (форма открытой цепи)

β-D-глюкоза · α-D-глюкоза

Стереоизомеры

Образование циклических соединений

Альдегидная группа или кетогруппа сахара может реагировать с гидроксильной группой

У больших по размеру сахаров ($n > 4$) это может произойти в пределах одной молекулы, что приводит к образованию 5- или 6-членного кольца

Система нумерации

Углеродные атомы сахара нумеруются с ближайшего к альдегидной группе или кетогруппе конца

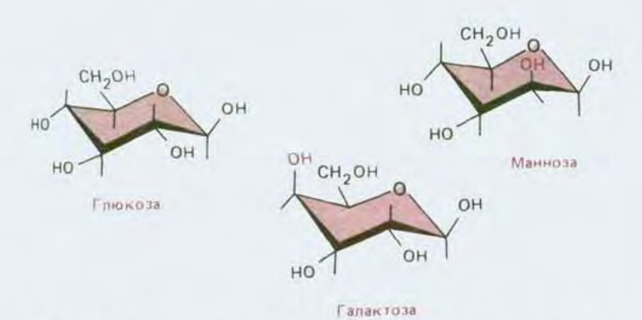
D-рибоза (форма открытой цепи)

β-D-рибоза · α-D-рибоза

Стереоизомеры

Стереоизомеры

Моносахариды имеют большое число изомеров, отличающихся лишь ориентацией их гидроксильных групп – например, глюкоза, галактоза и манноза являются изомерами



D- и L-формы

Два изомера, являющиеся зеркальным отражением друг друга, обладают одинаковым химическим строением и имеют поэтому одинаковые названия, различающиеся лишь приставкой D или L

D-глюкоза

плоскость зеркала

L-глюкоза

Схема 2-3. Некоторые типы сахаров, наиболее распространенные в клетке.

α- И β-СВЯЗИ

Гидроксильная группа углерода, несущего альдегидную группу или кетогруппу, может легко переходить из одного положения в другое. Эти два положения называются α- и β-*положениями*

β-гидроксильная группа

α-гидроксильная группа

Как только один сахар связывается с другим, α- или β-*форма фиксируется*

ПРОИЗВОДНЫЕ САХАРОВ

Гидроксильные группы простых моносахаридов могут замещаться другими группами. Например,

D-глюкуроновая кислота

D-глюкозамин

N-ацетил-D-глюкозамин

ДИСАХАРИДЫ

Два сахара могут *реагировать* друг с другом, образуя гликозидную связь. Три часто встречающихся *дисахарида* — это мальтоза (глюкозо-α-1,4-глюкоза), лактоза (галактозо-β-1,4-глюкоза) и сахароза (глюкозо-α-1,2-фруктоза)

α-1,4-гликозидная связь

ОЛИГОСАХАРИДЫ И ПОЛИСАХАРИДЫ

Большие линейные и разветвленные молекулы могут быть построены из простых повторяющихся единиц. Короткие цепи называются олигосахаридами, а длинные — полисахаридами. Например, гликоген — это полисахарид, целиком состоящий из соединенных друг с другом остатков глюкозы

α-1,6-связь образуется в точках ветвления

Гликоген

Все другие связи — это α-1,4-связи

СЛОЖНЫЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ

Во многих случаях нет повторяющихся последовательностей сахаров. Может существовать множество различных молекул. Такие сложные олигосахариды обычно связаны с белками или липидами

Олигосахарид, определяющий группу крови

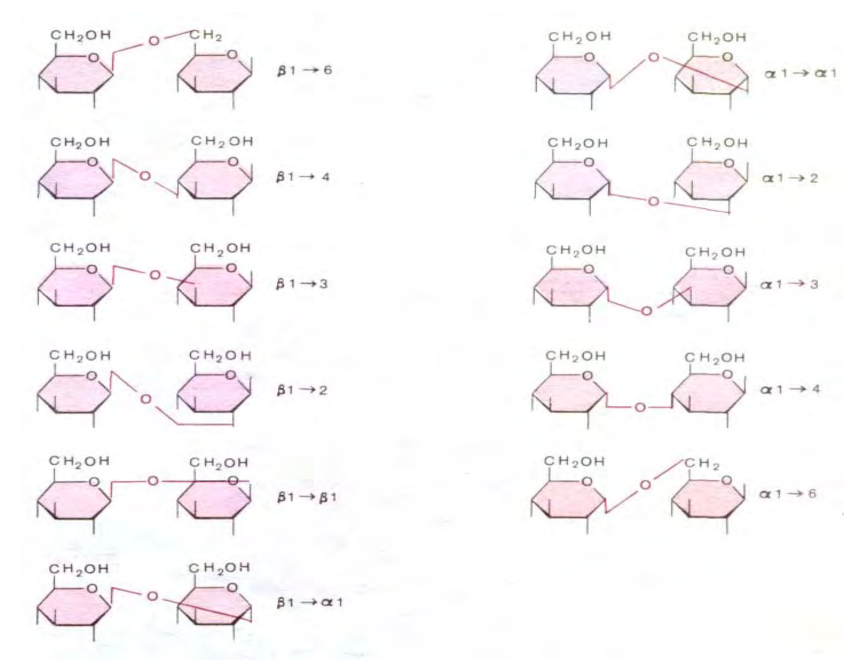


Рис. 2-4. Одиннадцать дисахаридов, построенных из двух остатков D-глюкозы. Хотя разница между ними состоит лишь в тине связи между двумя остатками глюкозы, в химическом отношении они различны. Олигосахариды, связанные с белками и липидами, могут включать в себя шесть и более разных видов Сахаров, которые имеют как линейное, так и разветвленное строение благодаря связям, подобным тем, которые показаны на этом рисунке. Следовательно, число возможных различных типов олигосахаридов необычайно велико.

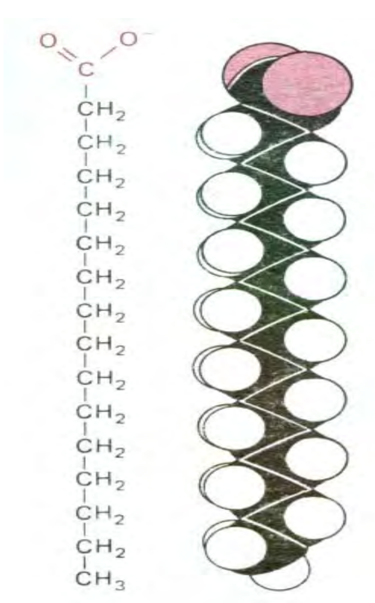


Рис. 2-5. Пальмитиновая кислота. Карбоксильная группа (выделена цветом) изображена в ионизированной форме. Справа показана пространственная модель молекулы.

уравнение реакции можно записать Следующим образом: $C_6H_{12}O_6 + CO_2 + 6CO_2 + 6H_2O$ + Энергия.

В ходе распада глюкозы высвобождается энергия и генерируется восстановительная способность, без чего невозможно протекание биосинтетических реакций. Высвобождающаяся энергия и генерируемая восстановительная сила запасаются в форме двух важнейших соединений - АТР и **NADH** (см. разд. 2.3.1).

Простые полисахариды, построенные из повторяющихся остатков глюкозы (в животных клетках это главным образом *гликоген,* а в растительных - *крахмал),* используются для запасания энергии впрок. Однако нельзя считать, что сахара служат исключительно для получения и запасания энергии. Так, из простых полисахаридов состоит важный внеклеточный структурный материал (например, целлюлоза), а цепочки неповторяющихся молекул Сахаров часто бывают ковалентно связаны с белками в *гликопротеинах* и с липидами в *гликолипидах.*

2.1.4. Жирные кислоты - компоненты клеточных мембран

В молекуле жирной кислоты, например в пальмитиновой кислоте (рис. 2-5), имеются две различные части: длинная углеводородная цепь, которая имеет гидрофобный характер (водонерастворима) и химически мало активна, и карбоксильная группа, ионизирующаяся в растворе, крайне гидрофильная (водорастворимая) и легко образующая эфиры и амиды. Действительно, почти во всех случаях молекулы жирных

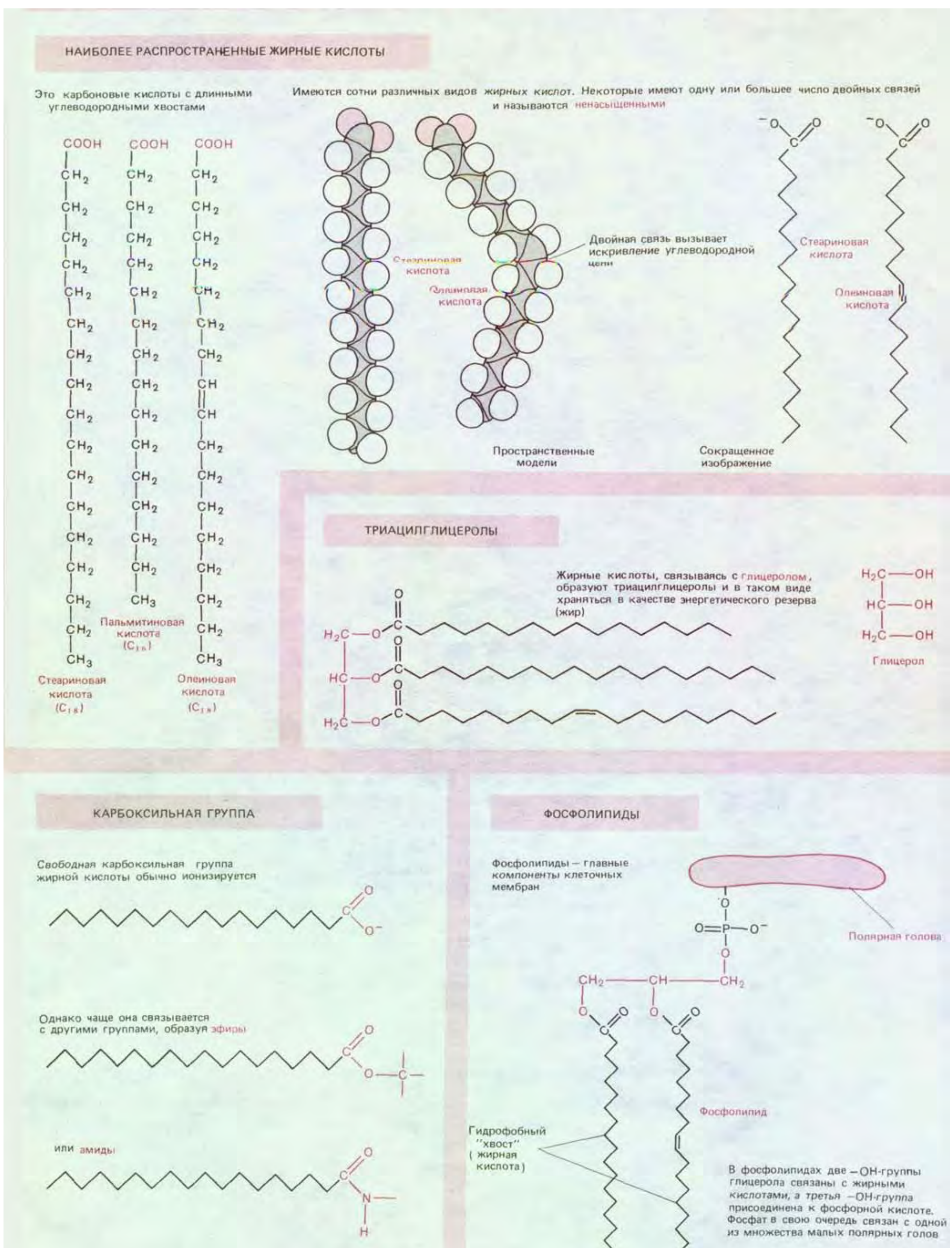
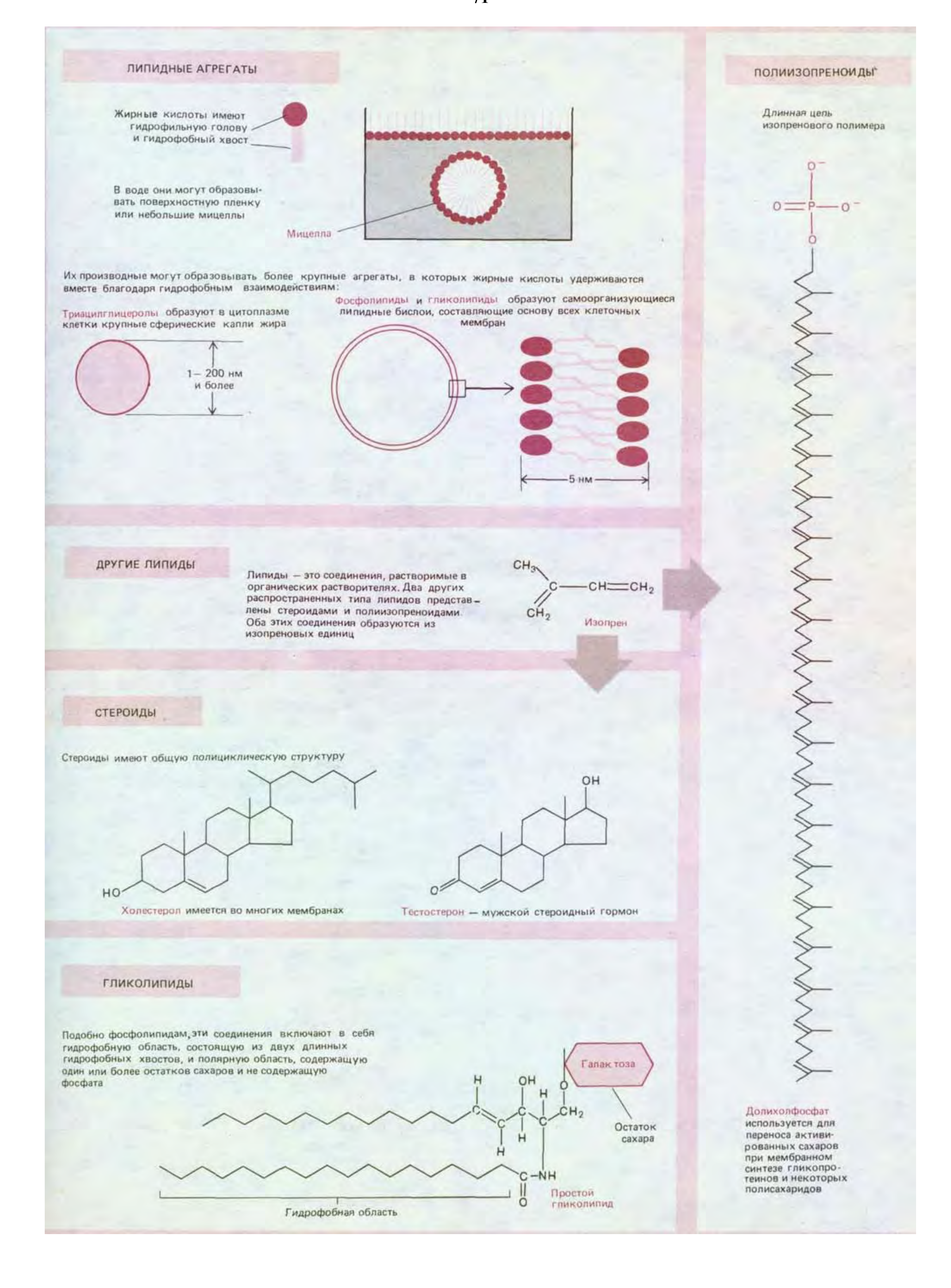


Схема 2-4. Некоторые типы жирных кислот, часто встречающихся в клетках, и образованные ими структуры.


ЛИПИДНЫЕ АГРЕГАТЫ
Жирные кислоты имеют гидрофильную голову и гидрофобный хвост
В воде они могут образовывать поверхностную пленку или небольшие мицеллы
Мицелла
Их производные могут образовывать более крупные агрегаты, в которых жирные кислоты удерживаются вместе благодаря гидрофобным взаимодействиям:
Триацилглицеролы образуют в цитоплазме клетки крупные сферические капли жира
1–200 нм и более
Фосфолипиды и гликолипиды образуют самоорганизующиеся липидные бислои, составляющие основу всех клеточных мембран
5 нм
ДРУГИЕ ЛИПИДЫ
Липиды – это соединения, растворимые в органических растворителях. Два других распространенных типа липидов представлены стероидами и полиизопреноидами. Оба этих соединения образуются из изопреновых единиц
CH_3
C
CH=CH_2
CH_2
Изопрен
СТЕРОИДЫ
Стероиды имеют общую *полициклическую структуру*
HO
OH
O
Холестерол имеется во многих мембранах
Тестостерон – мужской стероидный гормон
ГЛИКОЛИПИДЫ
Подобно фосфолипидам, эти соединения включают в себя гидрофобную область, состоящую из двух длинных гидрофобных хвостов, и полярную область, содержащую один или более остатков сахаров и не содержащую фосфата
Галактоза
H
OH
H
C
CH_2
H
NH
O
Остаток сахара
Простой гликолипид
Гидрофобная область
ПОЛИИЗОПРЕНОИДЫ
Длинная цепь изопренового полимера
O^-
O=P–O^-
O
Долихолфосфат используется для переноса активированных сахаров при мембранном синтезе гликопротеинов и некоторых полисахаридов

кислот клетки ковалентно связаны с другими молекулами именно своими карбоксильными группами. Многие жирные кислоты, обнаруживаемые в клетках, отличаются друг от друга такими химическими свойствами, как длина углеводородной цепи, число и положение имеющихся в них двойных связей углерод—углерод (схема 2-4).

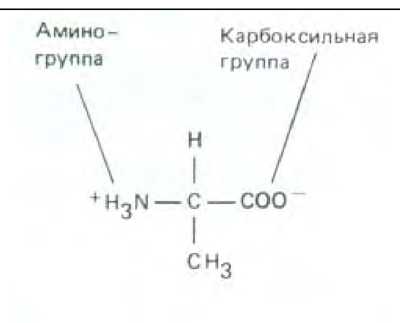
Жирные кислоты являются ценным источником энергии, поскольку их расщепление сопровождается образованием такого количества ATP, которое в два раза превышает образование ATP при расщеплении такого же количества (по массе) глюкозы. Жирные кислоты запасаются в цитоплазме многих клеток в виде капелек *триацилглицеролов (триглицеридов).* Молекулы триацилглицеролов состоят из трех цепей жирных кислот, каждая из которых присоединена к молекуле глицерола (схема 2-4); именно так устроены животные жиры, с которыми мы имеем дело в повседневной жизни. При необходимости цепи жирных кислот могут высвобождаться из триацилглицеролов и распадаться до двухуглеродных единиц. Такие двухуглеродные единицы, выходящие в виде ацетогруппы в водорастворимую молекулу, называемую *ацетил-СоА,* подвергаются дальнейшему расщеплению в различных экзергонических реакциях, которые рассматриваются в последующих разделах.

Но самая важная функция жирных кислот - участие в построении клеточных мембран. Эти тонкие плотные пленки, которыми одеты все клетки и внутриклеточные органеллы, состоят главным образом из **фосфолипидов** -- небольших молекул, сходных с триацилглицеролами наличием таких компонентов, как жирные кислоты, связанные с глицеролом. Однако в фосфолипидах глицерол чаще связан не с тремя, а лишь с двумя цепями жирных кислот. Оставшееся свободное место в молекуле глицерола обычно занимает фосфатная группа, которая в свою очередь соединена с другими небольшими гидрофильными группами - *этаноламином, холином* или *серином.*

У каждой фосфолипидной молекулы имеется гидрофобный хвост, состоящий из цепей двух жирных кислот, и гидрофильная полярная голова, в которой располагается фосфатная группа. Такие фосфолипидные молекулы, в сущности, представляют собой детергенты, о чем свидетельствуют их свойства. Небольшое количество фосфолипидов будет распределяться по водной поверхности с образованием фосфолипидного *монослоя.* В таком тонком слое очень тесно сближенные хвосты обращены в сторону воздуха, а головы погружены в воду (схема 2-4). Два подобных слоя могут соединяться «хвост к хвосту», образуя в результате фосфолипидный «сандвич», или *липидный бислой,* служащий структурной основой всех клеточных мембран.

2.1.5. Аминокислоты - субъединицы белков

Аминокислоты, содержащиеся в биологических тканях, различаются по химическому составу. Однако все они имеют ту общую особенность, что содержат карбоксильную группу и аминогруппу, связанные с одним и тем же углеродным атомом (рис. 2-6). Аминокислоты служат строительными блоками при синтезе белков - длинных линейных полимеров аминокислот, соединенных «хвост к голове» при помощи *пептидной связи* между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой (рис. 2-7). В белках встречается обычно 20 аминокислот с разными *боковыми цепями,* связанными с α-углеродным атомом (схема 2-5). Одни и те же 20 аминокислот неоднократно повторяются во всех белках, в том числе в белках бактериального, животного и растительного происхождения. Возможно, тот факт, что именно эти 20 аминокислот были отобраны в ходе эволюции, - один из примеров роли случая, но их химическое разнообразие имеет жизненно важное значение.



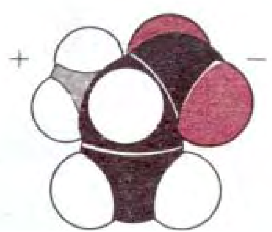


Рис. 2-6. Аминокислота аланин в ионизированной форме, в которой она находится при pH 7. При включении аланина в полипептидную цепь заряды амино- и карбоксильной групп, имеющиеся у свободной аминокислоты, исчезают. В нижней части рисунка представлена пространственная модель.

Рис. 2-7. Небольшая часть белковой молекулы. Четыре показанные на рисунке аминокислоты связаны друг с другом ковалентными связями, называемыми пептидными связями. Поэтому белок можно называть полипептидом. *Боковые цепи* аминокислот выделены цветом.

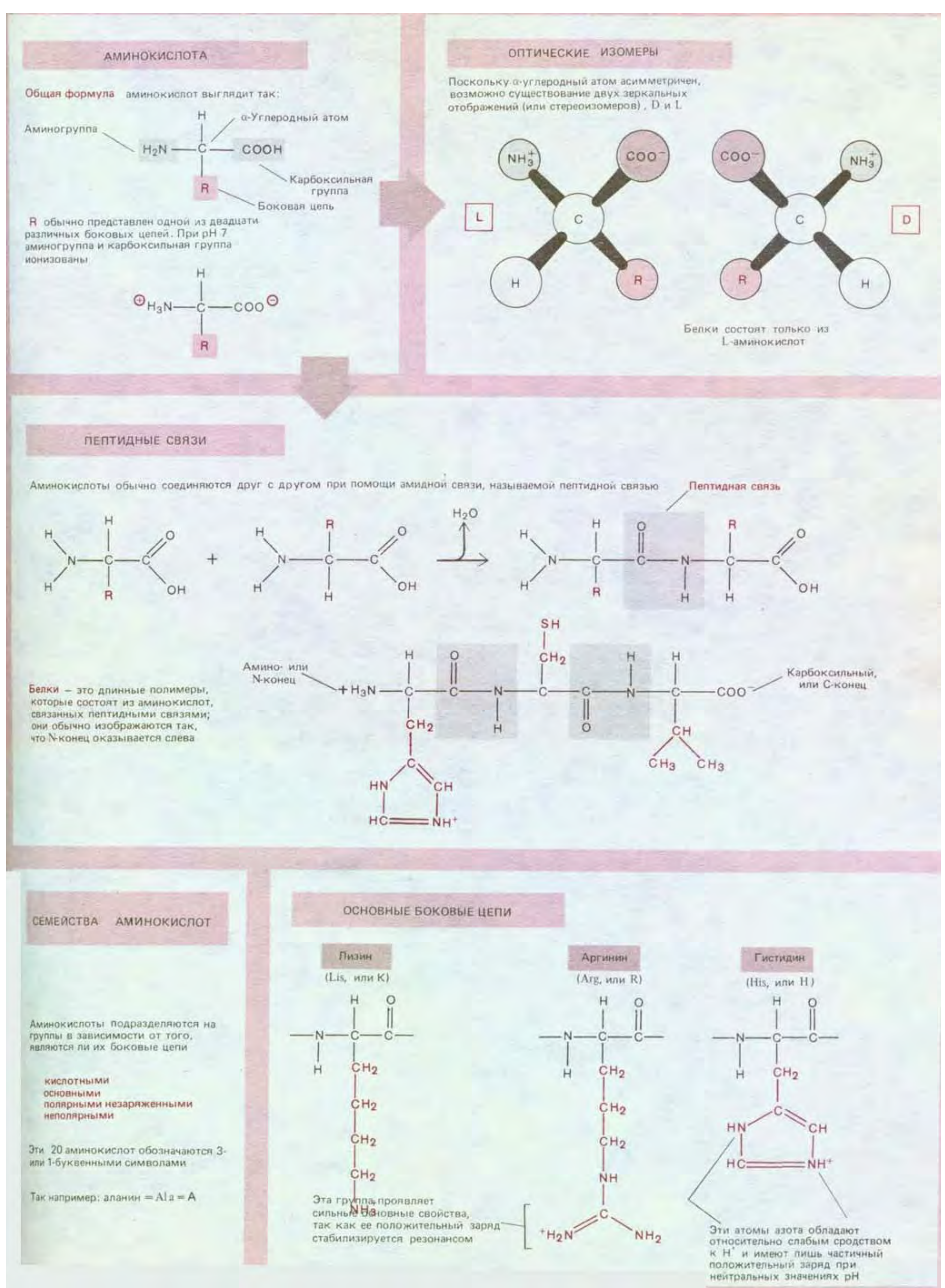
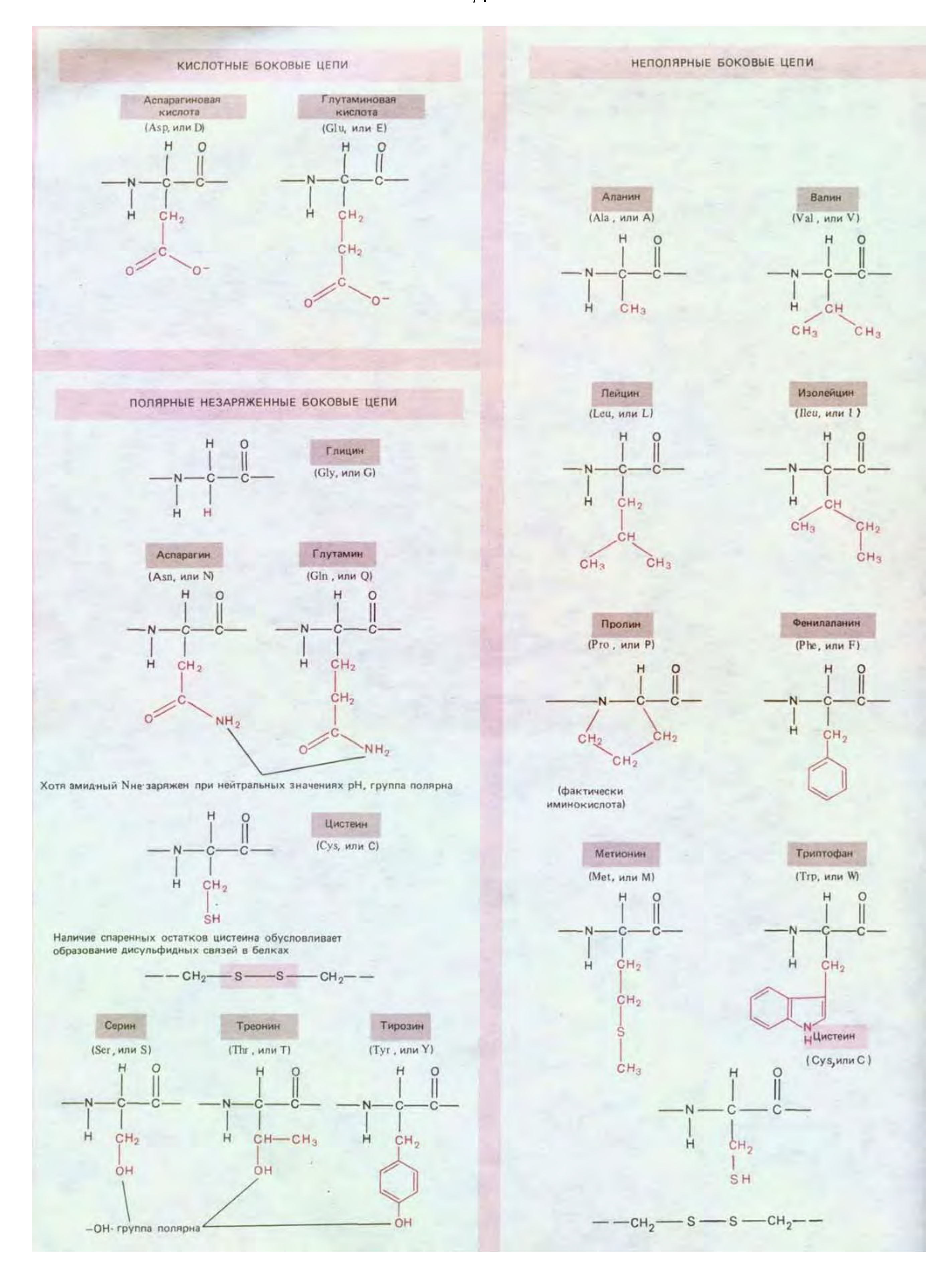


Схема 2-5. 20 аминокислот, участвующих в синтезе белка.



КИСЛОТНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ
Аспарагиновая кислота
(Asp, или D)
Глутаминовая кислота
(Glu, или E)
НЕПОЛЯРНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ
Аланин
(Ala, или A)
Валин
(Val, или V)
Лейцин
(Leu, или L)
Изолейцин
(Ileu, или I)
Пролин
(Pro, или P)
(фактически иминокислота)
Фенилаланин
(Phe, или F)
Метионин
(Met, или M)
Триптофан
(Trp, или W)
Цистеин
(Cys, или C)
ПОЛЯРНЫЕ НЕЗАРЯЖЕННЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ
Глицин
(Gly, или G)
Аспарагин
(Asn, или N)
Глутамин
(Gln, или Q)
Хотя амидный N не заряжен при нейтральных значениях pH, группа полярна
Цистеин
(Cys, или C)
Наличие спаренных остатков цистеина обусловливает образование дисульфидных связей в белках
Серин
(Ser, или S)
Треонин
(Thr, или T)
Тирозин
(Tyr, или Y)
–OH- группа полярна

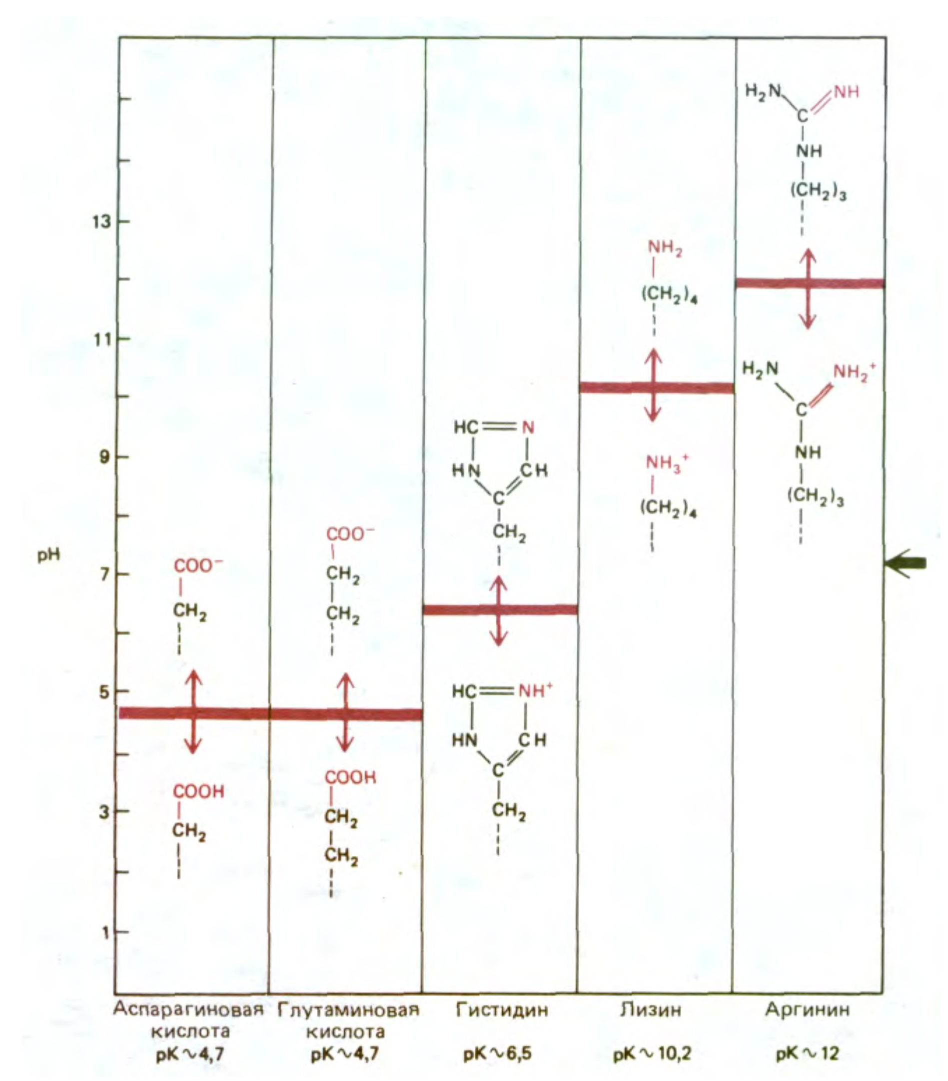


Рис. 2-8. Заряд боковых цепей аминокислот зависит от значения pH. Карбоновые кислоты в водном растворе легко теряют H^+, образуя отрицательно заряженный ион, обозначаемый с помощью суффикса «ат», например аспартат или глутамат. Сравнимая ситуация имеет место в случае аминов, которые, захватывая в водном растворе ион H^+, превращаются в положительно заряженный ион (он не имеет специального названия). Эти реакции легко обратимы, и количество двух форм (заряженной и незаряженной) зависит от pH раствора. При высоких значениях pH карбоновые кислоты имеют тенденцию к приобретению заряда, а у аминов заряд отсутствует. При низких значениях pH наблюдается обратная ситуация: карбоновые кислоты не несут заряда, а амины заряжены. pH, при котором ровно *половина* остатков карбоновых кислот или аминов заряжена, называют *pK* аминокислоты. В клетке pH близко к 7 и почти все карбоновые кислоты и амины находятся в заряженном состоянии.

Например, у 5 из 20 аминокислот боковые цепи могут нести заряд (рис. 2-8), тогда как боковые цепи других аминокислот электронейтральны, но обладают способностью вступать в реакции посредством образования специфических связей (схема 2-5). Как мы увидим, особенности боковых цепей всех аминокислот, входящих в состав данного белка, определяют его свойства и лежат в основе всех сложных и разнообразных функций белковых молекул.

2.1.6. Нуклеотиды субъединицы ДНК и РНК [5]

В нуклеотидах одно из нескольких азотсодержащих циклических соединений (называемых часто *основаниями,* поскольку они способны присоединять в кислой среде ион H^+) связано с пятиуглеродным сахаром *(рибозой* или *дезоксирибозой),* который несет еще и фосфатную группу. Между азотсодержащими кольцами, встречающимися в нуклеотидах, имеется близкая родственная связь. *Цитозин* (C), *тимин* (T) и *урацил* (U) называются **пиримидиновыми основаниями,** так как они представляют собой простые производные шестичленного пиримидинового кольца; *гуанин* (G) и *аденин* (A) **- пуриновые основания,** второе пятичленное кольцо которых сконденсировано с шестичленным циклом. Каждому нуклеотиду присвоено название, соответствующее названию входящего в его состав уникального основания (схема 2-6).

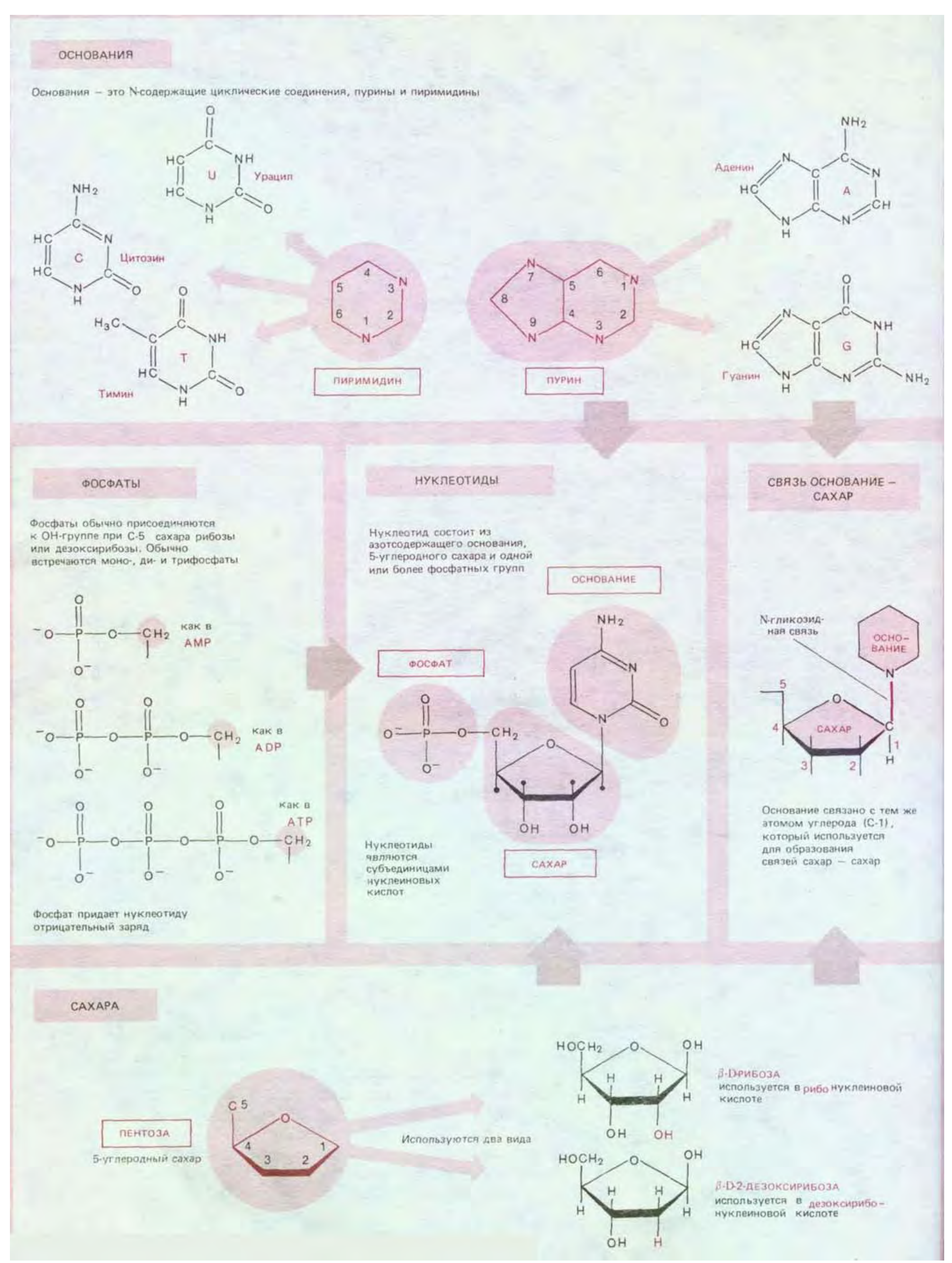


Схема 2-6. Основные типы нуклеотидов и их производные, встречающиеся в клетках.

НОМЕНКЛАТУРА

Названия можно перепутать, но сокращенные обозначения достаточно ясны

ОСНОВАНИЕ + САХАР = НУКЛЕОЗИД

ОСНОВАНИЕ + САХАР + ФОСФАТ = НУКЛЕОТИД

ОСНОВАНИЕ	НУКЛЕОЗИД	СОКРАЩЕННОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ
Аденин	Аденозин	A
Гуанин	Гуанозин	G
Цитозин	Цитидин	C
Урацил	Уридин	U
Тимин	Тимидин	T

Нуклеотиды сокращенно обозначаются тремя заглавными буквами следующим образом:

AMP — аденозинмонофосфат
dAMP — дезоксиаденозинмонофосфат
UDP — уридиндифосфат
ATP — аденозинтрифосфат
и т. д.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеотиды соединяются друг с другом при помощи простой фосфодиэфирной связи, образуя нуклеиновые кислоты

Линейная последовательность нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты обычно сокращенно записывается с помощью однобуквенного кода, A-G-C-T-T-A-C-A; 5′-конец цепи ставится слева

Пример: ДНК

НУКЛЕОТИДЫ ВЫПОЛНЯЮТ МНОГО ДРУГИХ ФУНКЦИЙ

1. Они переносят химическую энергию благодаря наличию легко гидролизующихся кислотно-ангидридных связей

Пример: ATP

2. Они соединяются с другими группами, образуя коферменты

Пример: кофермент A (CoA)

3. Они используются в клетке в качестве специфических сигнальных молекул

Пример: циклический AMP

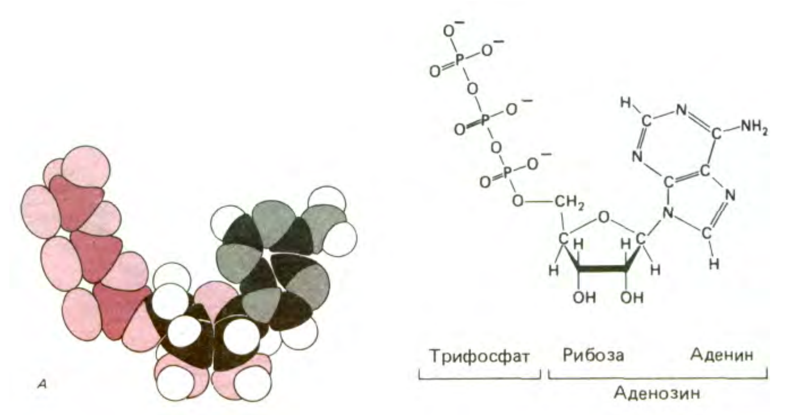


Рис. 2-9. Химическое строение аденозинтрифосфата (АТР). Показаны пространственная модель *(А)* и структурная формула (Б) молекулы.

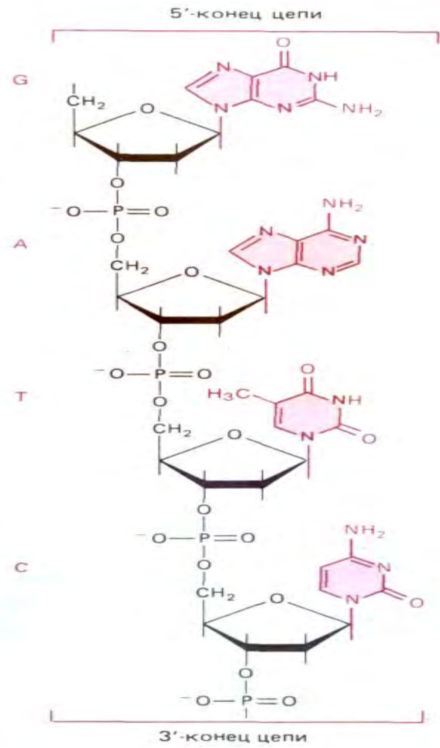


Рис. 2-10. Короткий отрезок дезоксирибонуклеиновой кислоты, или ДНК. ДНК и близкородственная ей РНК - нуклеиновые кислоты клетки. Показанный на рисунке отрезок цепи ДНК содержит нуклеотидную последовательность G-A-T-C.

Нуклеотиды могут выступать в качестве переносчиков энергии. При этом трифосфатный эфир аденина АТР (рис. 2-9) гораздо чаще, чем другие нуклеотиды, участвует в переносе энергии между сотнями индивидуальных внутриклеточных реакций. Концевой фосфат АТР образует ковалентную связь в процессе окисления питательных веществ; энергия, высвобождаемая при гидролизе этой фосфатной группы, может использоваться в любом другом месте для осуществления биосинтетических процессов, протекающих с затратой энергии. Другие производные нуклеотидов служат переносчиками отдельных химических групп, таких, как атомы водорода или остатки Сахаров, с одной молекулы на другую. Кроме того, циклическое фосфорилированное производное аденина*циклический AMP (cAMP)* -служит универсальным внутриклеточным сигналом и регулирует скорость множества различных внутриклеточных реакций.

Как уже упоминалось в гл. 1, особенно велика роль нуклеотидов в хранении биологической информации. Нуклеотиды служат строительными блоками для синтеза **нуклеиновых** кислот - длинных полимеров, в которых нуклеотидные субъединицы соединяются между собой ковалентной связью, образуя фосфорный эфир между 3'-гидроксильной группой остатка сахара одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой следующего (рис. 2-10). Существуют два основных типа нуклеиновых кислот, различающихся видом сахара, который входит в состав их полимерного остова. Нуклеиновые кислоты, сахар которых представлен *рибозой,* называются **рибонуклеиновыми кислотами** или **РНК;** они содержат основания A, U, G и С. Те нуклеиновые кислоты, в состав которых входит *дезоксирибоза* (в ней гидроксильная группа при С-2 рибозы замещена на атом водорода), называются **дезоксирибонуклеиновыми кислотами** или **ДНК;** они содержат основания A, T, G и С. В последовательности оснований в полимерных молекулах ДНК и РНК заключена генетическая информация живой клетки. Способность азотистых оснований молекул различных нуклеиновых кислот «узнавать» друг друга путем нековалентного взаимодействия (называемого **спариванием оснований) - G** с С и А с Т или U - лежит в основе механизмов наследственности и эволюции. Этот вопрос рассматривается в следующей главе.

Заключение

Живые организмы - это автономные самовоспроизводящиеся химические системы. Они построены из специфического и вместе с тем ограниченного набора углеродсодержащих малых молекул, как правило, одних и тех же для всех видов живых существ. Основные группы этих молекул представлены сахарами, жирными кислотами, аминокислотами и нуклеотидами. Сахара служат важнейшим источником энергии для клеток и запасают ее, образуя резервные полисахариды. Жирные кислоты, как и сахара, имеют важное значение для запасания энергии, но самая главная их функция - образование клеточных мембран. Полимеры, построенные из аминокислот, представлены удивительно разнообразными и многофункциональными молекулами белков. Нуклеотиды участвуют во внутриклеточной передаче сигналов и играют центральную роль в переносе энергии, однако их уникальное значение состоит в том, что они являются субъединицами информационных молекул РНК и ДНК.

2.2. Упорядоченность биологических систем и энергия [6]

Клетки должны подчиняться законам физики и химии. Принципы механики и закон сохранения и превращения энергии можно применить к клетке точно так же, как и к паровой машине. Однако нельзя не признать, что клеткам присущ ряд особенностей, которые приводят нас в замешательство и на первый взгляд, казалось бы, ставят клетки в особое положение. Как показывает повседневная практика, все, что предоставлено самому себе, в конце концов приходит в неупорядоченное состояние: здания разрушаются, мертвые организмы подвергаются гниению и т.д. Эта общая тенденция выражена во *втором законе термодинамики,* который гласит, что в любой изолированной системе степень неупорядоченности может только возрастать.

Озадачивает то обстоятельство, что живые системы на всех уровнях организации в высшей степени упорядочены. Порядок с удивительной ясностью виден и в больших структурах, таких, как крыло бабочки или глаз осьминога, и в субклеточных образованиях, например в митохондриях или жгутике, и в форме и расположении составляющих их молекул. Множество атомов собрано в исключительно точные структуры, а ведь в конечном счете все они были извлечены из окружающей среды, где находились в крайне неорганизованном состоянии. Даже неделящимся клеткам для выживания требуется поддержание постоянного порядка. Поскольку все организованные структуры клетки подвержены нарушениям, необходимы системы, исправляющие их. Каким же образом это укладывается в рамки термодинамики? Далее мы увидим, что ответ на этот вопрос заключается в следующем: клетка постоянно выделяет теплоту в окружающую среду и, следовательно, с точки зрения законов термодинамики не является изолированной системой.

2.2.1. Упорядоченность биологических систем обусловлена выделением клеткой тепловой энергии [7]

Некоторые принципы термодинамики легче усвоить, если клетку и ее ближайшее окружение рассматривать как закрытый ящик, который находится в однородном море вещества, представляющего собой остальную часть Вселенной (рис. 2-11). Для того, чтобы расти и обеспечивать свое существование, клетка должна постоянно поддерживать порядок внутри ящика. Однако, как уже было сказано, второй закон

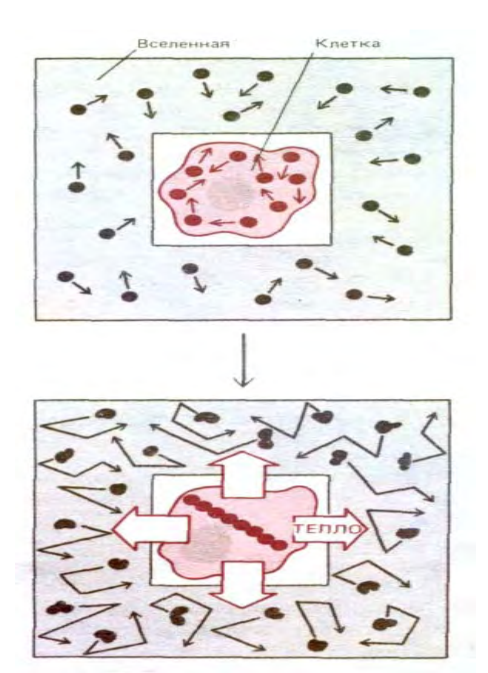


Рис. 2-11. Для простого термодинамического анализа живой клетки можно использовать следующий подход: считается, что клетка и ее ближайшее окружение находятся в запаянном ящике, в котором они могут обмениваться с остальной частью Вселенной теплотой, но при этом не могут обмениваться молекулами. На верхнем рисунке молекулы клетки и остальной части Вселенной изображены в относительно неупорядоченном состоянии. На нижнем рисунке из клетки выделилось тепло в результате реакции, которая привела к упорядочению содержащихся в клетке молекул. Возрастание беспорядочного движения (в том числе деформаций связей) молекул остальной части Вселенной создает неупорядоченность, которая с избытком компенсирует увеличение упорядоченности в клетке, что находится в соответствии с законами термодинамики для спонтанных процессов. Таким образом, выделение клеткой тепла в окружающее пространство позволяет ей создавать более высокую степень внутренней упорядоченности. В то же время Вселенная в целом становится более неупорядоченной.

термодинамики гласит, что упорядоченность замкнутой системы должна всегда уменьшаться. Из этого следует, что возрастание упорядоченности внутри ящика всегда должно с избытком компенсироваться даже более интенсивным повышением неупорядоченности остальной части Вселенной. Хотя никакого обмена молекулами между ящиком и окружающей средой не происходит, они могут обмениваться теплотой - в этом количественно проявляется взаимосвязь между теплотой и порядком. Тепло представляет собой энергию хаотического движения молекул, т.е. энергию в наиболее неупорядоченной ее форме. Клетка, выделяя теплоту в пространство, увеличивает интенсивность движения молекул, вследствие чего возрастает хаотичность, или неупорядоченность, этого движения.

Существование количественного соотношения между теплотой и упорядоченностью, открытое в конце XIX столетия, в принципе дает нам возможность рассчитать, какое количество теплоты должна выделить клетка, чтобы компенсировать определенную степень упорядоченности внутри нее (такой, как сборка белков из аминокислот), причем суммарный процесс должен увеличивать степень неупорядоченности всей Вселенной. Такое соотношение можно получить, рассмотрев характер изменения движения молекул в результате перехода определенного количества тепловой энергии от горячего тела к холодному. Здесь нет необходимости представлять детальный расчет подобного процесса, отметим только, что химические реакции, которые протекают с выделением тепла, должны быть тесно связаны на молекулярном уровне именно с процессами, приводящими к упорядочению. Такие связанные между собой реакции, называются *сопряженными;* мы их рассмотрим позднее. Неразрывная связь между образованием тепла и повышением степени упорядоченности и отличает метаболизм клетки от расточительного процесса сгорания топлива.

На рис. 2-11 очень схематично показано, каким образом указанные сопряженные реакции выделяют тепловую энергию, приводящую к разупорядочению внеклеточной среды, вследствие чего компенсируется возрастание упорядоченности внутри клетки, происшедшее в результате этих реакций. Повышение степени неупорядоченности Вселенной - это именно тот процесс, благодаря которому протекание сопряженных реакций приводит к повышению упорядоченности внутри клетки.

Энергия не может возникать или исчезать в ходе химических реакций, поэтому постоянные потери тепла клеткой, приводящие к биологическому упорядочению, требуют непрерывного ввода энергии в клетку. Энергия должна существовать в форме, отличной от тепловой. Для растений первичным источником энергии служит электромагнитное излучение Солнца, животные же используют энергию ковалентных связей органических молекул, поступающих в организм с пищей. Однако, поскольку эти органические питательные вещества сами производятся фотосинтезирующими организмами, например зелеными растениями, первичным источником излучения для организмов обоих типов служит Солнце.

2.2.2. Фотосинтезирующие организмы используют солнечный свет для синтеза органических соединений [8]

Утилизация солнечной энергии живой природой *(биосферой)* происходит в результате **фотосинтеза,** осуществляемого фотосинтезирующими организмами - растениями и бактериями. В процессе фотосинтеза электромагнитная энергия преобразуется в энергию химических связей. Но в то же время часть энергии солнечного света переходит в тепло, и как раз выделение этого тепла в окружающее пространство увеличивает не-

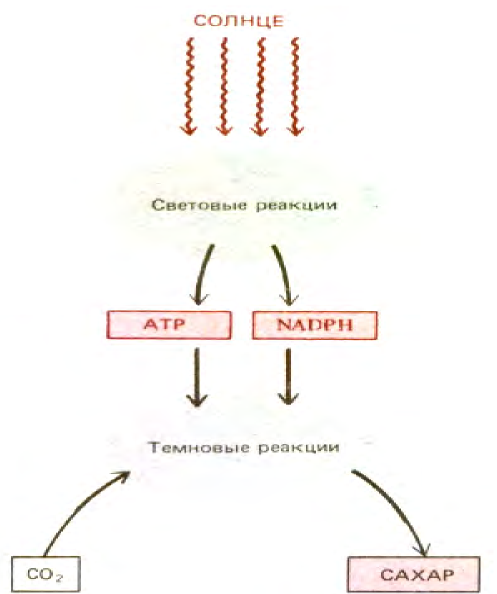


Рис. 2-12. Две стадии фотосинтеза у зеленых растений.

упорядоченность Вселенной, что и является движущей силой процесса фотосинтеза.

Реакции фотосинтеза подробно описываются в гл. 7; вообще говоря, они осуществляются в ходе двух различных фаз. В первой фазе *(световые реакции)* под действием квантов света электрон в молекуле пигмента переходит в возбужденное состояние; затем при возвращении к более низкому энергетическому уровню освобождается энергия, необходимая для синтеза таких молекул, как ATP и NADPH. Во второй фазе *(темповые реакции)* ATP и NADPH используются для поддержания ряда реакций фиксации углерода, в которых из углекислого газа воздуха образуются молекулы Сахаров (рис. 2-12).

Суммарный результат фотосинтеза (если речь идет о зеленых растениях) может быть записан в виде уравнения

$$\text{Энергия} + CO_2 + H_2O + \text{Сахар} + O_2,$$

т. е. обратного уравнению окислительного распада сахара. За этим простым выражением скрывается сложная природа темновых реакций, включающих множество взаимосвязанных парциальных реакций. Более того, тогда как первоначальная фиксация CO_2 приводит к образованию Сахаров, последующие метаболические реакции быстро преобразуют эти сахара в другие малые или большие молекулы, необходимые растительной клетке.

2.2.3. Химическая энергия переходит от растений к животным

Животные и другие нефотосинтезирующие организмы не способны непосредственно утилизировать энергию солнечного света, поэтому они вынуждены существовать за счет энергии, получаемой «из вторых рук», т.е. поедая растения, или даже «из третьих рук» - поедая других животных. Органические молекулы, синтезируемые растительными клетками, обеспечивают питающиеся этими растениями организмы как строительными белками, так и запасом «топлива». Подобным целям могут служить растительные молекулы всех типов - сахара, белки, полисахариды, липиды и многие другие.

Не все взаимодействия между растениями и животными столь однонаправлены. Растения, животные и микроорганизмы так долго

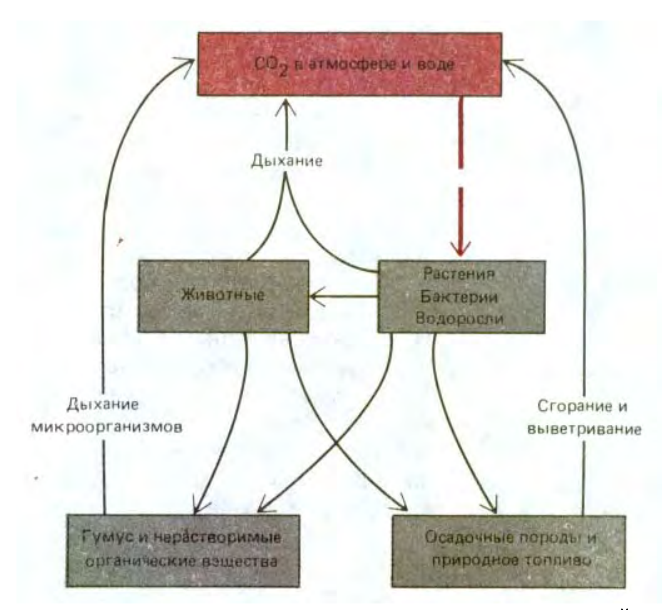


Рис. 2-13. Круговорот углерода. Отдельные атомы углерода включаются в органические молекулы живой природы в результате фотосинтетической активности растений, бактерий и морских водорослей. Эти атомы поступают в клетки животных и микроорганизмов, а также в органические соединения почвы и океанов по циклическим путям. Когда органические молекулы окисляются клетками или сжигаются людьми в качестве природного топлива, CO_2 возвращается в атмосферу.

сосуществовали на нашей планете, что многие стали для других организмов необходимым элементом окружающей среды. Кислород, выделяющийся при фотосинтезе, потребляется почти всеми организмами для окисления органических молекул; часть молекул CO_2, которая сегодня фиксируется с образованием более крупных органических молекул в процессе фотосинтеза, осуществляемого в зеленых листьях, еще вчера была выделена в атмосферу при дыхании животного. Таким образом, утилизация углерода - циклический процесс, который охватывает всю биосферу и устанавливает связи между отдельными организмами (рис. 2-13). Подобно этому, атомы азота, фосфора и серы могут переходить от одной биологической молекулы к другой в серии аналогичных циклов.

2.2.4. Клетки получают энергию в результате окисления биологических молекул [9]

Атомы углерода и водорода в клетке находятся далеко не в самом стабильном состоянии. Поскольку земная атмосфера содержит огромное количество кислорода, энергетически наиболее стабильной формой существования углерода является CO_2, а кислорода - H_2O. Следовательно, клетка может получать энергию из молекул белков или глюкозы, создавая подходящие условия для того, чтобы атомы углерода и водорода этих молекул соединялись с кислородом, образуя соответственно CO_2 и H_2O. Однако окисление молекул в клетке осуществляется не в одну стадию, как, например, при горении. Молекулам приходится пройти через большое число реакций, из которых лишь очень немногие включают в себя непосредственное присоединение кислорода. Для того чтобы мы могли рассмотреть все эти реакции и понять, какие движущие силы за ними скрываются, нам необходимо создать себе ясное представление о процессе окисления.

Окисление в вышеописанном значении этого слова не ограничивается лишь присоединением атома кислорода; этот термин носит скорее более общий характер и применим к любой реакции, в которой электроны переходят от одного атома к другому. В таком смысле **окислением** можно назвать удаление электронов, а **восстановлением** (процессом, обратным окислению) - присоединение электронов. Так, Fe^{2+} окисляется, если теряет электрон, и превращается в Fe^{3+} , а атом хлора восстанавливается, если он получает электрон и переходит в С1-. Та же терминология используется, когда речь идет лишь о частичном смещении электронов в случае атомов, связанных ковалентной связью. Например, когда атом углерода ковалентно связывает такой электроотрицательный атом, как кислород, хлор или сера, он как бы в определенной степени уступает им свой электрон, приобретая частичный положительный заряд, и может считаться окисленным. И наоборот, в связи С—Н электроны в большей степени смещены к атому углерода, поэтому можно считать, что он восстановлен (рис. 2-14).

При «сгорании» питательных веществ в клетке атомы С и Н органических молекул (находящихся в сравнительно богатом электронами, или восстановленном, состоянии) превращаются в CO_2 и H_2O, в которых они отдают свои электроны кислороду и поэтому сильно окислены. Перенос электронов от углерода и водорода к кислороду позволяет всем этим атомам достичь наиболее стабильного состояния и является поэтому энергетически выгодным.

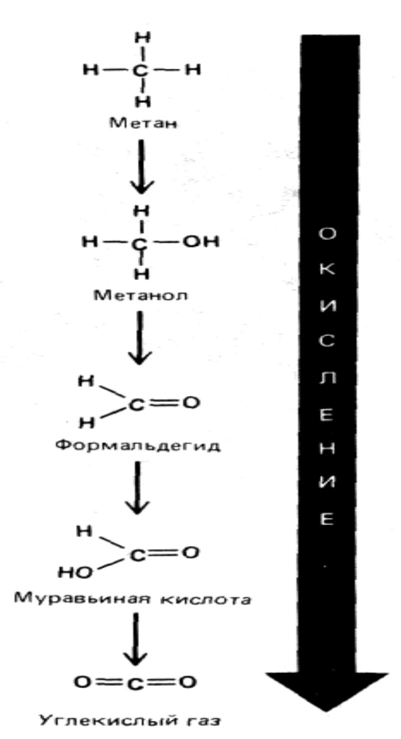


Рис. 2-14. Атом углерода метана включается в диоксид углерода путем последовательного удаления атомов водорода. На каждом этапе электроны все дальше смещаются от атома углерода, по мере того как он переходит в более стабильное энергетическое состояние (иначе говоря, становится все более окисленным).

2.2.5. Распад органических молекул осуществляется в результате последовательных ферментативных реакций [10]

Хотя энергетически наиболее выгодной формой существования углерода является CO_2, а водорода - H_2O, живой организм не обращается в дым по той же причине, по которой книга в вашей руке не вспыхивает пламенем: и организм, и книга суть метастабильное энергетическое состояние вещества (рис. 2-15), которое нуждается в *энергии активации* для перехода в более стабильную форму. В случае с книгой энергия активации может быть получена от зажженной спички. Для живой клетки тот же конечный результат может достигаться не столь радикальным и разрушительным способом. Высокоспецифичные белковые катализаторы, или **ферменты,** соединяются с биологическими молекулами таким образом, что снижают энергию активации тех конкретных реакций, в которые могут вступить данные молекулы. Избирательно понижая энергию активации той или иной последовательности реакций (метаболического пути), ферменты определяют, какая из нескольких альтернативных возможностей будет реализована (рис. 2-16). Именно таким путем различные молекулы клетки направляются по специфическим последовательностям реакций, что в конечном счете и определяет химизм клетки.

Процветание различных форм жизни в значительной степени можно приписать способности клеток к образованию большого числа специфических ферментов. Каждый фермент представляет собой белок с уникальной трехмерной структурой (конформацией), формирующей *активный центр,* в котором определенный набор молекул (субстратов) связывается с поверхностью фермента. Связывание субстрата с ферментом приводит к тому, что скорость одной из многих химических реакций, которым может подвергнуться субстрат, зачастую возрастает в 10^{14} раз. Подобно всем другим катализаторам, молекулы ферментов не претерпевают никаких изменений после завершения процесса катализа и могут поэтому вновь и вновь выполнять свои функции.

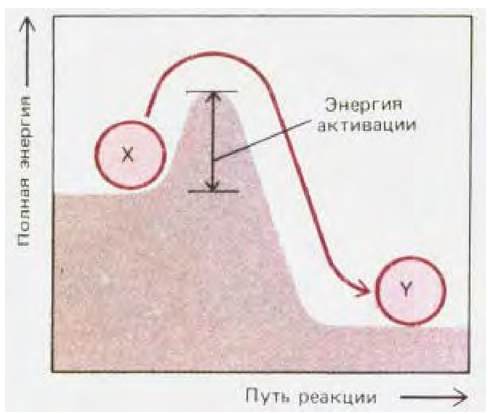


Рис. 2-15. Схема, поясняющая принцип действия энергии активации. Соединение X может достигнуть более низкого энергетически выгодного состояния путем превращения в соединение Y. Однако такого перехода не произойдет до тех пор, пока X не получит энергии активации, достаточной для того, чтобы это соединение могло вступить в реакцию.

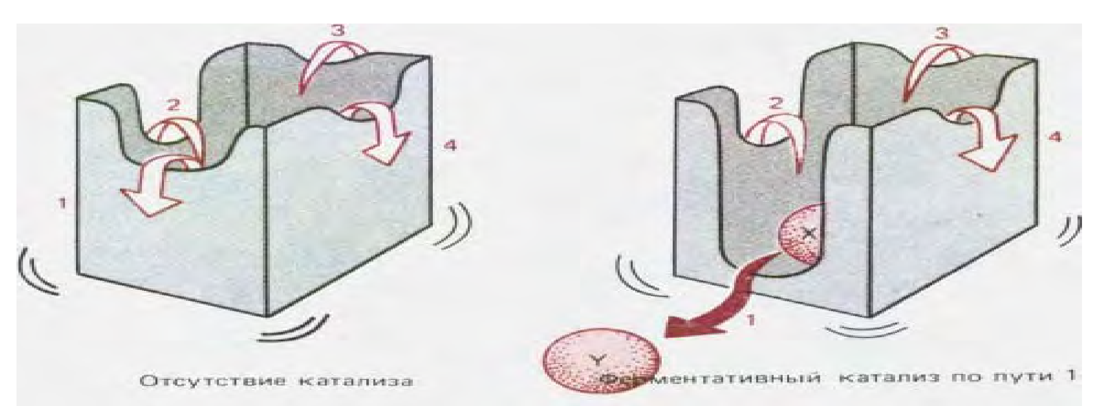
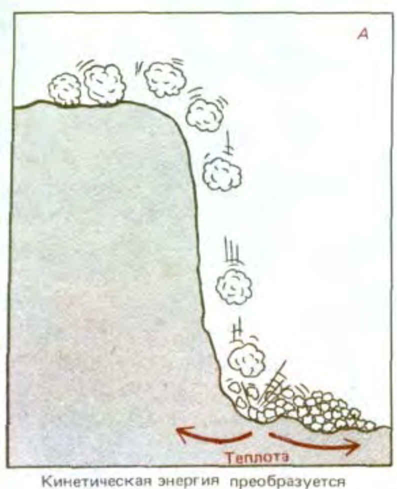
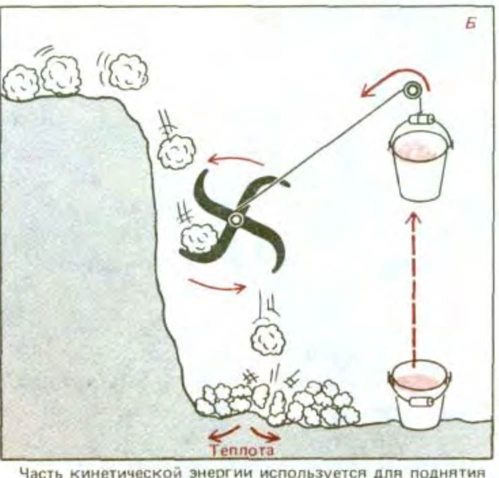


Рис. 2-16. «Модель качающегося ящика», иллюстрирующая, каким образом ферменты направляют молекулы в нужные метаболические пути. В этой модели раскрашенный мяч (соединение X) представляет собой возможный субстрат ферментативной реакции; мяч скачет вверх и вниз благодаря непрерывной бомбардировке сталкивающимися молекулами воды. Четыре стенки ящика изображают энергию активации (энергетический барьер) для четырех различных энергетически выгодных химических реакций. В ящике слева ни одна из этих реакций не осуществляется, так как энергии, получаемой мячом при столкновениях, недостаточно для преодоления какого-либо из энергетических барьеров. В правом ящике ферментативный катализ понижает энергию активации лишь для реакции 1, поэтому осуществление данной реакции (превращение соединения X в соединение Y) возможно при имеющемся количестве энергии.

2.2.6. Часть энергии, выделенной в реакциях окисления, расходуется на образование ATP [11]

Клетки получают необходимую энергию в результате «сгорания» глюкозы только потому, что они «сжигают» ее в очень сложных и тонко контролируемых процессах. Синтетические, или *анаболические,* химические реакции, обусловливающие упорядоченность биологических систем, тесно связаны с реакциями распада *(катаболическими* реакциями),





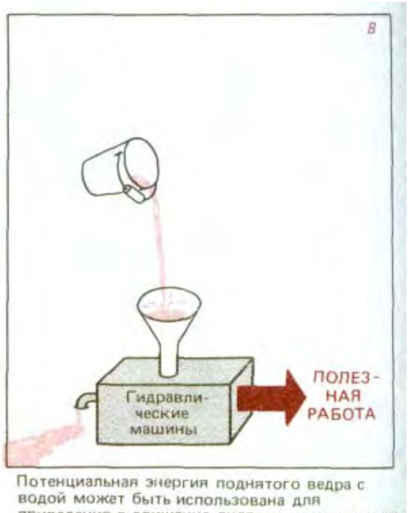


Рис. 2-17. Механическая модель, иллюстрирующая принцип сопряженных химических реакций. *А.* Спонтанная реакция может служить аналогией непосредственного окисления глюкозы до CO_2 и H2O, сопровождающегося образованием только тепла. *Б.* Та же реакция сопряжена со второй реакцией; эта вторая реакция может служить аналогией синтеза АТР. Большое многообразие форм энергии, получаемой в случае Б, можно использовать для инициирования других клеточных процессов, аналогично тому, как это показано на рис. *В.* АТР представляет собой наиболее универсальную форму хранения энергии клетки.

поставляющими энергию. Принципиальное различие между **сопряженной** и несопряженной катаболическими реакциями хорошо иллюстрируется механической аналогией. На рис. 2-17 энергетически выгодная химическая реакция показана на примере падения булыжников с утеса. Кинетическая энергия падающих булыжников, как правило, целиком преобразуется в тепло при ударе их о землю (рис. 2-17, *А).* Однако при продуманном подходе часть кинетической энергии можно использовать для приведения в движение лопастного колеса, поднимающего ведро с водой (рис. 2-17, Б). Как видно из этого рисунка, булыжники достигают земли, лишь проворачивая колесо. Следовательно, самопроизвольная реакция - падение булыжника - непосредственно связана с несамопроизвольной реакцией - подъемом ведра с водой. Поскольку часть энергии теперь расходуется на выполнение работы (Б), булыжники достигают земли с меньшей скоростью, чем в случае А, и, следовательно, меньшая часть энергии теряется в виде тепла.

Ферменты в клетке играют ту же роль, что и лопастное колесо в нашем примере, и связывают самопроизвольное окисление питательных веществ с реакциями, в которых образуется нуклеотидтрифосфат АТР. Энергию, запасенную в поднятом на некоторую высоту ведре с водой (рис. 2-17), можно небольшими порциями расходовать на приведение в движение самых разнообразных гидравлических машин (рис. 2-17, В); точно так же и энергия, аккумулированная в АТР - этой универсальной энергетической валюте, - может использоваться для обеспечения множества различных химических реакций, необходимых клетке.

2.2.7. Гидролиз АТР обеспечивает упорядоченность в клетке [12]

Каким образом АТР выполняет роль переносчика химической энергии? В условиях, существующих в норме в цитоплазме, гидролиз АТР с освобождением неорганического фосфата (Pi) осуществляется очень легко и сопровождается выделением большого количества биологически полезной энергии (разд. 2.4.1). Химическая группа, соединенная с молекулой АТР такой реакционноспособной связью, легко переходит на другую молекулу, поэтому можно считать, что концевой фосфат АТР находится в *активированном* состоянии. Связи, подвергающиеся разрыву в подобных реакциях гидролиза, иногда называют *высокоэнергетическими связями.* Существенно важно, что при гидролизе в водных растворах образуются две молекулы, обладающие значительно меньшими

энергиями (ADP и Pl); сами же ковалентные связи никакими специфическими особенностями не обладают.

Прочие химические реакции могут протекать за счет энергии, выделяющейся при гидролизе АТР, при условии, что они так или иначе сопряжены с этим процессом. Среди многих сотен реакций, запускаемых гидролизом АТР, следует отметить реакции синтеза биологических молекул, активный транспорт через клеточные мембраны, а также реакции, обусловливающие генерирование механических сил клеток и способность к движению. Процессы этих трех типов играют решающую роль в упорядоченности биологических систем. Макромолекулы, образующиеся в биосинтетических реакциях, переносят информацию, катализируют специфические реакции и организуются в исключительно упорядоченные структуры как в клетке, так и во внеклеточном пространстве. Связанные с мембраной насосы поддерживают специфический состав внутриклеточной среды и способствуют передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов. Наконец, наличие механических сил и способности к движению делает возможным самоорганизацию цитоплазматического содержимого клетки, а также позволяет самим клеткам перемещаться и группироваться с образованием специализированных тканей.

Заключение

Живые клетки в высшей степени упорядочены, причем поддержание упорядоченности необходимо им для роста и выживания. С термодинамической точки зрения это возможно лишь благодаря постоянному вводу энергии, часть которой выделяется клетками в окружающую среду в виде тепла. Вообще говоря, первичным источником энергии является электромагнитное излучение Солнца; в фотосинтезирующих организмах, таких, как зеленые растения, под его воздействием образуются органические молекулы. Животные получают энергию, захватывая эти органические молекулы и окисляя их в ряде ферментативных реакций, сопряженных с образованием А ТР. А ТР представляет собой универсальную энергетическую валюту для всех клеток, и гидролиз этого соединения, сопряженный с другими реакциями, запускает множество энергетически невыгодных процессов, обеспечивая таким образом создание упорядоченности.

2.3. Питательные вещества и источники энергии клетки [6, 13]

2.3.1. Молекулы питательных веществ, расщепляясь в три этапа, образуют АТР

Белки, липиды и полисахариды, составляющие большую часть нашей пищи, должны расщепиться на меньшие по размеру молекулы, для того чтобы клетки могли их использовать. Ферментативный распад, или катаболизм, этих молекул можно подразделить на три стадии (рис. 2-18). Сначала мы в общих чертах охарактеризуем все эти стадии, а затем обсудим две из них более подробно.

На стадии 1 крупные молекулы полимеров распадаются на мономерные субъединицы: белки на аминокислоты, полисахариды на сахара, а жиры на жирные кислоты и холестерол. Этот предварительный процесс, называемый *пищеварением,* осуществляется главным образом вне клеток под действием ферментов, секретируемых в полость пищеварительного тракта. На стадии 2 образовавшиеся небольшие молекулы

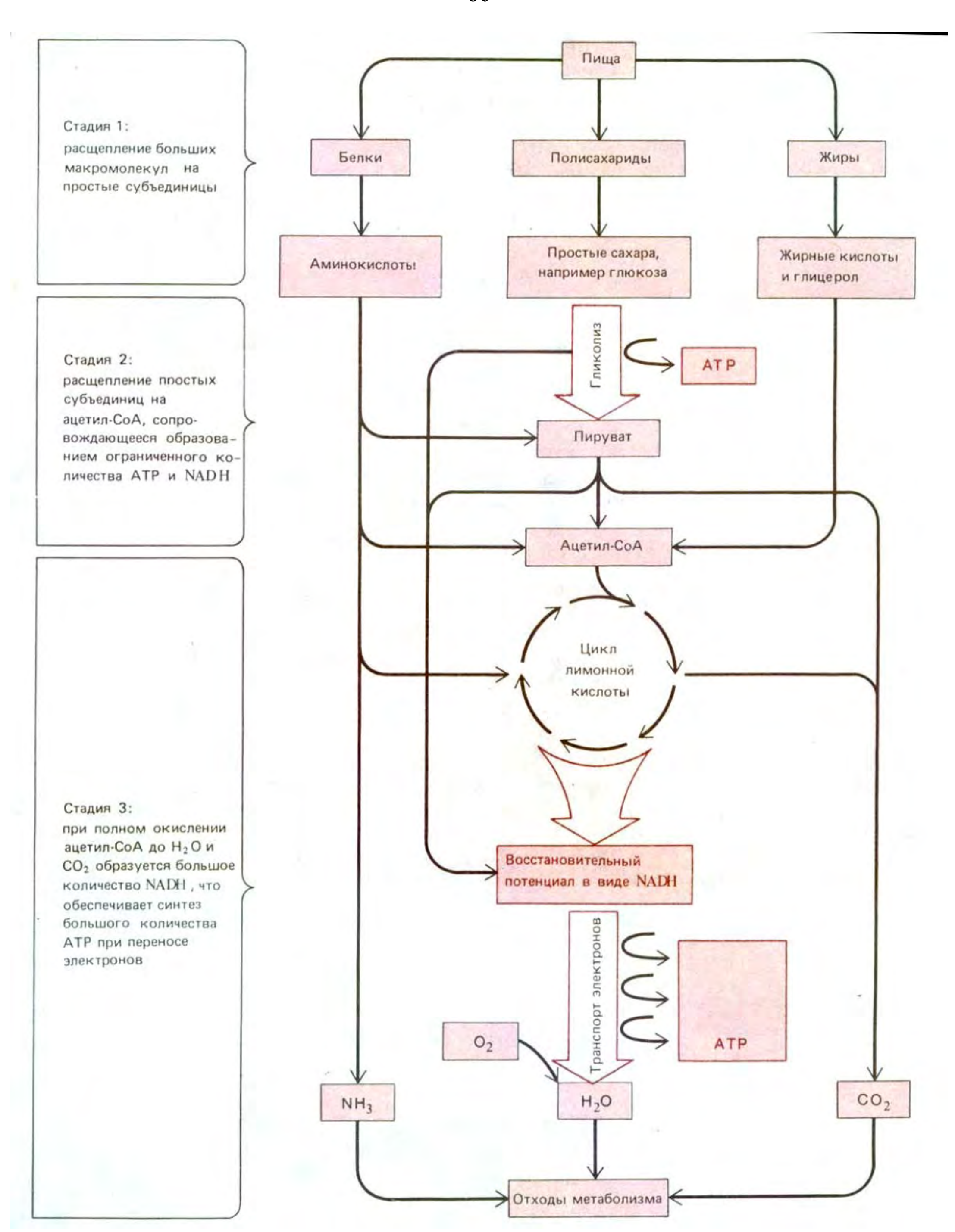


Рис. 2-18. Упрощенная схема трех стадий катаболизма, ведущих от молекул пищевых Веществ к продуктам распада. В этой серии реакций образуется АТР, использующийся затем в биосинтетических реакциях и других энергозависимых процессах.

поступают в клетки и подвергаются дальнейшему расщеплению в цитоплазме. Большая часть углеродных и водородных атомов Сахаров превращается в *пируват,* который, проникнув в митохондрии, образует там ацетильную группу химически активного соединения *ацетилкофермента А (ацетил-СоА)* (рис. 2-19). Большое количество ацетил-СоА образуется также при окислении жирных кислот. На стадии 3 происходит полное расщепление ацетильной группы ацетил-СоА до CO_2 и H_20. Именно на этой заключительной стадии образуется большая часть АТР.

В серии сопряженных химических реакций больше половины той энергии,

Рис. 2-19. Строение ключевого промежуточного продукта метаболизма - кофермента А (ацетил-CoA). Ацетильные группы, образующиеся на стадии 2 катаболизма (см. рис. 2-18), ковалентно связаны с коферментом А (CoA).

которую, согласно теоретическим расчетам, можно извлечь из углеводов и жиров при окислении их до H_2O и CO_2, используется для осуществления энергетически невыгодной реакции Pi + ADP -> ATP. Поскольку остальная часть энергии, высвобождающейся при окислении, выделяется клеткой в виде тепла, результатом образования ATP является общее возрастание неупорядоченности Вселенной, что полностью соответствует второму закону термодинамики.

Благодаря образованию ATP энергия, первоначально извлеченная путем окисления из углеводов и жиров, преобразуется в более удобную концентрированную форму химической энергии. В растворе, находящемся во внутриклеточном пространстве типичной клетки, имеется примерно 1 млрд. молекул ATP, гидролиз которых до ADP и фосфата обеспечивает необходимой энергией множество энергетически невыгодных реакций.

2.3.2. ATP в процессе гликолиза может образовываться даже в отсутствие кислорода

Самым важным этапом стадии 2 катаболизма является **гликолиз** последовательность реакций, приводящих к расщеплению глюкозы. При гликолизе молекула глюкозы, содержащая шесть атомов углерода, превращается в две молекулы пирувата, содержащие по три атома углерода каждая. Для такого превращения требуется девять последовательных ферментативных реакций, в которых происходит образование

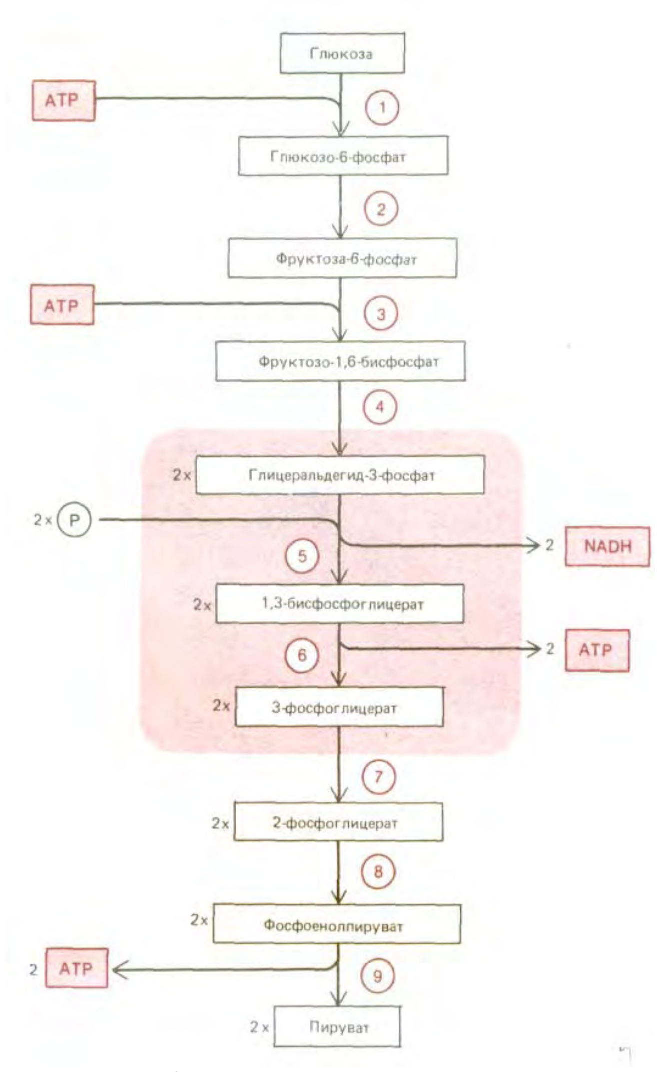


Рис. 2-20. Промежуточные продукты гликолиза. Каждая из пронумерованных реакций катализируется особым ферментом. На этапе *4* шестиуглеродный сахар расщепляется, давая два трехуглеродных сахара, так что после этой реакции число молекул на каждом этапе удваивается. Реакции 5 и 6 ответственны за суммарный синтез ATP и NADH (см. рис. 2-21).

ряда промежуточных фосфатсодержащих соединений (рис. 2-20). Логически рассуждая, последовательность реакций гликолиза можно разделить на три этапа: 1) в *реакциях 1-4* глюкоза превращается в трехуглеродный альдегид *глицеральдегид-3-фосфат* (для этого превращения нужны две фосфатные группы, а необходимая энергия выделяется при гидролизе ATP); 2) в *реакциях 5* и 6 альдегидная группа каждой молекулы глицеральдегид-3-фосфата окисляется до карбоксильной, и выделяющаяся при этом энергия расходуется на синтез ATP из ADP и неорганического фосфата; 3) в *реакциях 7, 8* и 9 те две молекулы фосфата, которые присоединились к сахару на первой стадии, переносятся обратно на ADP, в результате чего образуется ATP и компенсируются затраты ATP на этапе 1.

Суммарный выход энергии при гликолизе сводится к синтезу двух молекул ATP (на одну молекулу глюкозы), которые образовались в реакциях 5 и 6. Таким образом, данные реакции имеют решающее значение для гликолиза. Эти две реакции - единственные во всем процессе, в которых из неорганического фосфата формируется высокоэнергетическая фосфатная связь, - иллюстрируют, каким образом может осуществляться взаимосвязь внутриклеточных реакций для реализации

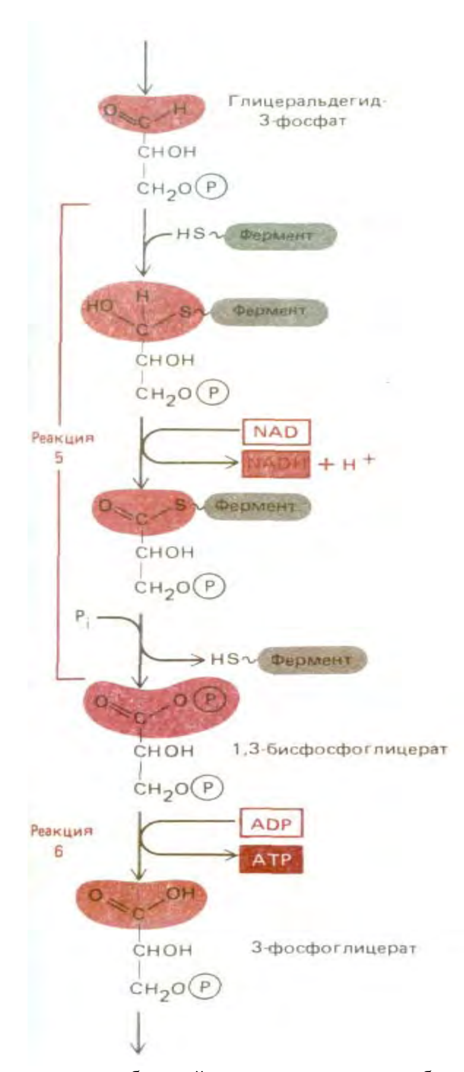


Рис. 2-21. Этапы 5 и 6 гликолиза: окисление альдегида до карбоновой кислоты сопряжено с образованием ATP и NADH (см. также рис. 2-20). Этап 5 начинается с образования ковалентной связи между ферментом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и углеродом альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата. Затем углерод (в виде гидрид-иона: протона плюс двух электронов) отщепляется от связанной с ферментом альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата и переносится к молекуле-переносчику NAD^+ (см. рис. 2-22). В результате этой окислительной стадии образуется карбонильная группа сахара, соединенная с ферментом высокоэнергетической связью. Затем фосфат-ион из раствора разрывает эту связь, образуя вместо нее высокоэнергетическую сахарофосфатную связь. В двух этих последних реакциях фермент обеспечивает *сопряжение* энергетически выгодного процесса окисления альдегида с энергетически невыгодным процессом образования высокоэнергетической связи. Наконец, на этапе *6* гликолиза новообразованная реактивная фосфатная группа переносится на ADP, вследствие чего образуется ATP, а на окисленном сахаре остается свободная карбоксильная группа.

выделяющейся при окислении энергии (рис. 2-21). Суммарным результатом этих двух реакций является окисление сахарного альдегида в фосфоглицероловую кислоту, перенос неорганического фосфата на ADP с образованием высокоэнергетической связи ATP и восстановление NAD^+ до NADH (рис. 2-22). Возможно, что в процессе эволюции эта изящная пара сопряженных реакций возникла на самых ранних этапах метаболизма. Кроме того, имея первостепенное значение для метаболизма глюкозы, эти реакции в процессе фотосинтеза протекают в противоположном направлении за счет NADPH и ATP, образующихся в реакциях, активируемых светом. В связи с этим они играют центральную роль в фотосинтетическом процессе фиксации углерода на стадии образования глицеральдегид-3-фосфата (см. разд. 7.3.4).

Для большинства клеток животных гликолиз служит лишь прелюдией к стадии 3 катаболизма, так как образующаяся при гликолизе молочная кислота быстро поступает в митохондрии, где полностью окисляется до CO_2 и H_2O. Тем не менее у анаэробных организмов (т. е. таких, которые не используют молекулярного кислорода) и тканей (например, скелетных мышц), способных работать в анаэробных условиях, гликолиз может стать основным источником клеточного ATP. В этих случаях вместо того, чтобы подвергнуться расщеплению в митохондриях, молекулы пирувата остаются в цитозоле и в зависимости от вида организма могут превращаться либо в этанол плюс CO_2 (в дрожжах), либо в лактат (в мышцах), которые затем выводятся из клеток. Дальнейшее превращение пирувата в этих энергодающих реакциях, называемых **брожением,** требуется для того, чтобы полностью использовать восстановительный потенциал, полученный в реакции 5 гликолиза, и таким путем регенерировать NAD^+, необходимый для дальнейшего осуществления гликолиза (см. разд. 7.4.1).

2.3.3. Окислительный катаболизм поставляет значительно большее количество биологически полезной энергии [14]

Анаэробное образование ATP из глюкозы в реакциях гликолиза относительно неэффективно. Конечные продукты анаэробного гликолиза все еще несут в себе очень большое количество химической энергии, которая может выделиться при последующем окислении. Развитие *окислительного катаболизма* (клеточное дыхание) стало возможным лишь после того, как в результате фотосинтеза, осуществляемого цианобактериями, в атмосфере Земли было накоплено достаточное коли-

Рис. 2-22. NADH и NAD^+ - наиболее важные переносчики водорода в катаболических реакциях. *А.* Строение молекул NADH и NAD^+. NAD это сокращенное обозначение никотинамидадениндинуклеотида; в самом названии отражена структура молекулы, правая часть (на рисунке) которой представлена аденозинмонофосфатом (АМР). Часть молекулы NAD^+, называемая никотинамидным кольцом (в цветном прямоугольнике), может присоединять атом водорода с лишним электроном (гидрид-ион, Н~), восстанавливаясь до NADH. В такой восстановленной форме никотинамидное кольцо менее стабильно, поскольку в этом случае отсутствует стабилизирующее влияние резонанса. В результате присоединившийся гидрид-ион переносится на другие молекулы. *Б.* Пример реакции с участием NAD^+ и NADH. При биологическом окислении молекулы субстрата, например спирта, субстрат теряет два атома водорода. Один из них в виде гидрид-иона присоединяется к NAD^+, образуя NADH, тогда как другой выделяется в раствор в виде протона H^+ (см. рис. 7-18).

чество молекулярного кислорода. До тех пор, пока это не произошло, доминирующей формой поддержания жизни были, по-видимому, анаэробные катаболические процессы. Добавление к катаболическому процессу стадии, требующей присутствия кислорода (стадия 3 на рис. 2-18), обеспечивает клетки значительно более мощным и эффективным методом извлечения энергии из молекул питательных веществ. Эта стадия (стадия 3) начинается с *цикла лимонной кислоты* (его называют также циклом трикарбоновых кислот или циклом Кребса) и завершается *окислительным фосфорилированием:* оба процесса имеют место в аэробных бактериях и митохондриях эукариотических клеток.

2.3.4. Центральным процессом метаболизма является цикл лимонной кислоты [15]

Главная функция цикла лимонной кислоты - окисление ацетогруппы, включающейся в этот цикл в форме молекул ацетил-СоА. Процесс этот носит циклический характер, поскольку ацетогруппа окисляется не сразу, а лишь после того, как она ковалентно присоединится к более крупной молекуле - *оксалоаиетату,* которая регенерируется после каждого оборота цикла. Как показано на рис. 2-23, цикл начинается с реакции ацетил-СоА с оксалоацетатом, приводящей к образованию молекулы трикарбоновой кислоты, называемой *лимонной кислотой* (или *цитратом).* Затем следует серия реакций, в которых два из шести атомов углерода

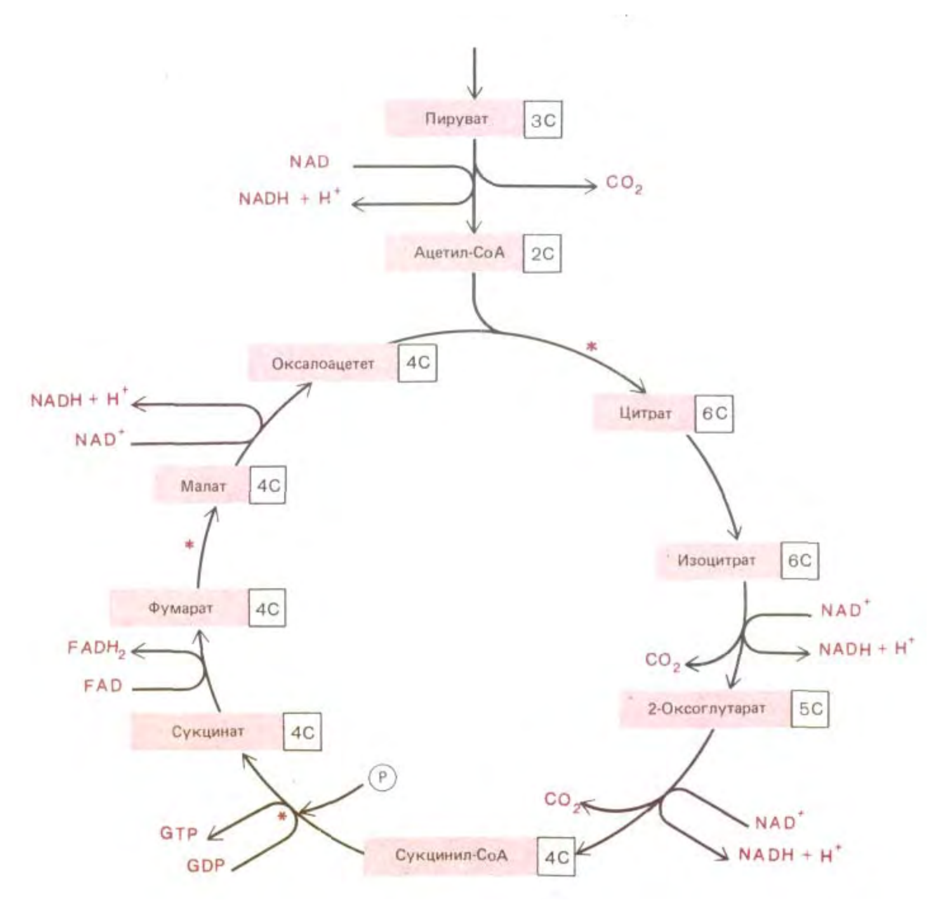


Рис. 2-23. Цикл лимонной кислоты. В митохондриях и клетках аэробных бактерий ацетогруппы, образованные из пирувата, подвергаются дальнейшему окислению. Атом углерода ацетильной группы превращается в CO_2, водородные же атомы переносятся к молекулам-переносчикам NAD^+ и FAD. Дополнительные атомы кислорода и водорода включаются в цикл в виде молекул воды на стадиях, отмеченных звездочками (*). Более детально цикл лимонной кислоты показан на рис. 7-14.

цитрата окисляются до CO_2, образуя молекулу оксалоацетата - исходного продукта для нового цикла. (Поскольку два новых атома углерода, присоединяемых в каждом цикле, входят не в ту часть молекулы цитрата, которая окисляется в данном цикле до CO_2, должно пройти несколько циклов, прежде чем подойдет их очередь окислиться.) Молекулы CO_2, образующиеся в подобных реакциях, затем диффундируют из митохондрий (или из бактерий) и покидают клетку.

Энергия, высвобождающаяся при окислении связей С—Н и С—С цитрата, потребляется несколькими различными способами в цикле лимонной кислоты. В одной из реакций цикла (сукцинил-CoA $\longrightarrow$ сукцинат) высокоэнергетическая фосфатная связь образуется под действием механизма, сходного с тем, который мы уже рассмотрели в случае гликолиза. (Хотя в реакции цикла образуется не АТР, а GTP, все нуклеозидтрифосфаты равноценны в энергетическом отношении благодаря реакциям обмена типа ADP + GTR $\rightleftarrows$ АТР + GDP.) Оставшаяся часть энергии, полученной при окислении, расходуется на перевод молекул-переносчиков водорода (или гидрид-ионов) в восстановленную форму; в каждом обороте цикла три молекулы NAD^+ превращаются в NADH, а одна молекула *флавинадениндинуклеотида* (FAD) - в $FADH_2$. Энергия, переносимая на таких молекулах-переносчиках активированными атомами водорода, используется в реакциях *окислительного фосфорилирования;* для осуществления последних (они будут подробно рассмотрены ниже) необходим молекулярный кислород атмосферы.

Дополнительные атомы кислорода, необходимые для образования CO_2 из включающейся в цикл лимонной кислоты ацетильной группы, поставляются не молекулярным кислородом, а молекулой воды. В каж-

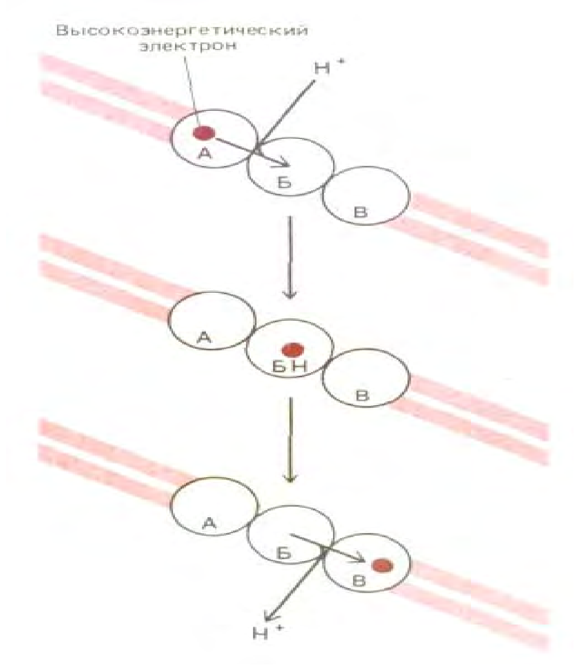


Рис. 2-24. Возникновение трансмембранного протонного градиента в результате реакций переноса электронов. Высокоэнергетический электрон (полученный, например, при окислении метаболита) последовательно переводится переносчиками А, Б и В в более низкое энергетическое состояние. На данной схеме переносчик Б располагается в мембране таким образом, что при прохождении электрона он захватывает ион H^+ с одной стороны от мембраны и высвобождает его с другой. Возникающий в результате градиент H^+ представляет собой форму запасания энергии; эта энергия используется другими белками митохондриальной мембраны для инициирования синтеза ATP (см. рис. 7-35).

дом цикле расщепляются три молекулы воды, атомы кислорода которых используются для образования CO_2. Некоторые из атомов водорода молекул воды связываются с молекулами субстрата, переходя в более высокое энергетическое состояние, и затем переносятся (вместе с атомами водорода ацетогруппы) к таким молекулам-переносчикам, как NADH.

В эукариотических клетках митохондрия - это центр, к которому ведут все катаболические пути независимо от того, что служит для них первоначальным субстратом-сахара, жиры или белки. Объясняется это тем, что не только пируват, но и жирные кислоты, равно как и некоторые аминокислоты, тоже поступают из цитозоля в митохондрии, где они превращаются в ацетил-СоА или в один из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты. Митохондрия служит также отправной точкой биосинтетических реакций, поскольку в ней образуются такие жизненно важные углеродсодержащие промежуточные продукты, как *оксалоацетат* и *2-оксоглутарат.* Эти соединения переносятся из митохондрии обратно в цитозоль, где они используются в качестве предшественников таких важнейших молекул клетки, как, например, аминокислоты.

2.3.5. При окислительном фосфорилировании перенос электронов к кислороду приводит к образованию ATP [9, 16]

Окислительное фосфорилирование является последней стадией катаболизма; в ходе этого процесса высвобождается большая часть метаболической энергии. При окислительном фосфорилировании молекулы NADH и $FADH_2$ переносят электроны, полученные ими от кислорода молекул питательных веществ, к молекулярному кислороду O_2. В этой реакции, которая формально равноценна сгоранию водорода в воздухе с образованием воды, высвобождается значительное количество химической энергии. Часть этой энергии используется для образования ATP; остальная энергия выделяется в виде тепла.

Хотя при окислении NADH и $FADH_2$ в конечном счете происходит перенос водорода к кислороду, водород транспортируется не в атомарном состоянии. Объектом переноса в данном случае служат *электроны* атома водорода. Это связано с тем, что атом водорода может легко диссоциировать на свои составные части - электрон и протон (H^+). Затем электрон может отдельно переноситься к молекуле, акцептирующей лишь электроны, а протоны при этом остаются в водном растворе. По той же причине в случае, когда к молекуле с сильным сродством к водороду присоединяется лишь электрон, автоматически образуется атом водорода, так как из раствора сразу же акцептируется протон. В ходе окислительного фосфорилирования электроны от NADH и $FADH_2$ переносятся по цепи молекул-переносчиков, но при этом форма, в которой они транспортируются (молекула водорода или электрон), зависит от природы переносчика.

В эукариотической клетке эта последовательность реакций переноса электронов по **электрон-транспортной цепи** локализована на внутренней митохондриальной мембране, в которую встроены все молекулы-переносчики. Перенос электронов сопровождается уменьшением их энергии на каждой ступени вплоть до конечной точки процесса, где электроны переносятся на молекулы кислорода. Поскольку молекулы кислорода обладают наибольшим сродством к электронам, связываясь с кислородом, электроны оказываются на самом нижнем энергетическом уровне. Энергия, выделяющаяся при переходе электронов на более низкие энергетические уровни, используется для перекачивания протонов из внутреннего пространства митохондрии наружу, причем механизм этого

процесса до конца еще не выяснен (рис. 2-24). В результате во внутренней митохондриальной мембране создается трансмембранный *электрохимический градиент протонов.* Этот градиент в свою очередь обусловливает обратное перемещение протонов через ферментный комплекс в мембране; особый фермент этого комплекса (АТР-синтетаза) катализирует присоединение фосфатной группы к ADP с образованием в митохондрии АТР. Вновь синтезированный АТР переносится из митохондрии в другие части клетки, где он используется для осуществления множества метаболических реакций.

Природа электрон-транспортной цепи и механизм синтеза АТР подробно рассматриваются в гл. 7.

2.3.6. Аминокислоты и нуклеотиды принимают участие в круговороте азота

В метаболических процессах, рассмотренных в предыдущих разделах, участвовали главным образом углеводороды. До сих пор мы не обсуждали метаболизма азота или серы. Эти два элемента являются важными компонентами белков и нуклеиновых кислот - двух самых необходимых макромолекул клетки, на долю которых приходится 2/3 ее сухой массы. Претерпевая различные превращения в ряде обратимых циклических процессов, атомы азота и серы переходят из одного соединения в другое и из тканей различных организмов во внешнюю среду.

Молекулярный азот в изобилии содержится в земной атмосфере, однако химически он неактивен. Лишь небольшое число видов живых существ способно непосредственно включать азот в органические молекулы с помощью процесса, называемого **азотфиксацией.** Фиксация азота осуществляется особыми микроорганизмами. Кроме того, она происходит и при некоторых геофизических процессах, таких, как вспышка молнии. Фиксация азота имеет критическое значение для биосферы, так как без этого процесса жизнь на нашей планете была бы невозможна. Тем не менее у современных организмов лишь небольшая часть азотистых соединений образуется в результате непосредственной фиксации азота. Основная масса органического азота циркулирует в течение некоторого времени, переходя от одного организма к другому. Таким образом, можно сказать, что азотфиксирующие реакции обеспечивают пополнение общих запасов азота.

Позвоночные получают практически весь азот из содержащихся в их рационе белков и нуклеиновых кислот. В организме эти макромолекулы расщепляются до аминокислот или нуклеотидов, из которых потом образуются новые белки и нуклеиновые кислоты или другие молекулы. Около половины из 20 аминокислот, входящих в состав белков, представляют собой *незаменимые аминокислоты* (рис. 2-25): они не могут синтезироваться в организме и должны обязательно поступать с пищей. Остальные аминокислоты могут синтезироваться с использованием разнообразных исходных веществ, в число которых входят и промежуточные продукты цикла лимонной кислоты. Незаменимые аминокислоты образуются в организмах других живых существ - обычно в ходе длительных и энергоемких процессов; метаболические пути этих процессов были утеряны позвоночными в ходе эволюции.

Нуклеотиды, необходимые для образования ДНК и РНК, могут синтезироваться в ходе специализированных биосинтетических процессов: не существует «незаменимых нуклеотидов», которые должны непременно поступать в организм в составе пищи. Все атомы азота, входящие в состав пуриновых и пиримидиновых оснований (как и некоторые углеродные атомы), попадают в них из богатых азотом

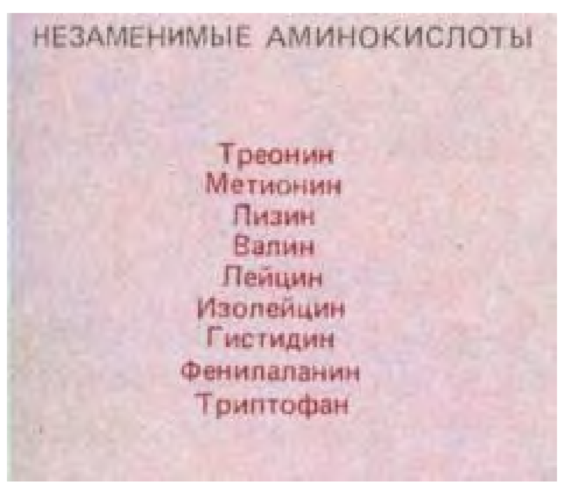


Рис. 2-25. Девять незаменимых аминокислот, которые не синтезируются в клетках человека и поэтому должны поступать в организм с пищей.

аминокислот - глутамина, аспарагиновой кислоты и глицина, а рибоза и дезоксирибоза являются производными глюкозы.

Аминокислоты, не используемые для биосинтеза, могут окисляться, выделяя метаболическую энергию. Большинство входящих в них атомов углерода и водорода образуют в итоге CO_2 и H_2O. Атомы же азота, многократно переходя из одной формы в другую, в конце концов выводятся из организма в виде мочевины. Пути превращений различных аминокислот не одинаковы, и метаболизм этих соединений включает множество разнообразных ферментативных реакций.

Заключение

Считается, что клетки животных извлекают энергию из пищи в три этапа. На первом этапе белки, полисахариды и жиры расщепляются в результате внеклеточных реакций на малые молекулы. На втором этапе эти малые молекулы расщепляются в клетках с образованием ацетил-CoA, а также небольшого количества ATP и NADH. Такие реакции - единственные, в которых энергия может выделяться и в отсутствие кислорода. На третьей стадии молекулы ацетил-CoA расщепляются в митохондриях, образуя CO2 и атомы водорода, которые связываются с молекулами таких переносчиков, как NADH. Электроны от атомов водорода переходят по сложной цепи переносчиков, что в конечном счете приводит к восстановлению молекулярного кислорода и образованию воды. Под действием энергии, высвобождающийся на разных стадиях переноса электронов, ионы водорода (H^+) транспортируются из внутреннего пространства митохондрии наружу. Возникающий в результате трансмембранный электрохимический градиент протонов во внутренней митохондриальной мембране поставляет энергию для синтеза основного количества молекул ATP клетки.

2.4. Биосинтез и создание упорядоченности [17]

В каждый момент времени в клетке протекают тысячи различных химических реакций. Реакции эти связаны между собой и образуют последовательности, в которых продукт одной реакции служит субстратом для следующей. Большинство внутриклеточных реакций можно, вообще говоря, отнести к двум типам: катаболические и биосинтетические. Катаболические реакции мы уже рассмотрели в предыдущем разделе, теперь речь пойдет о реакциях биосинтеза. Такие реакции начинаются от промежуточных продуктов гликолиза и цикла лимонной кислоты (и родственных им соединений) и приводят в результате к образованию более крупных и сложных молекул клетки.

2.4.1. Возможность протекания реакции определяется величиной изменения свободной энергии [18]

Хотя ферменты ускоряют энергетически выгодные реакции, они никак не могут индуцировать энергетически невыгодные реакции. Используя аналогию с водой, можно сказать, что сами по себе ферменты не способны заставить воду течь вверх. Но чтобы клетка могла расти и делиться, в ней должны происходить именно такие процессы: клетки обязаны строить большие и сложные молекулы из малых и простых. Мы уже видели, что это происходит главным образом благодаря ферментам, под действием которых энергетически выгодные реакции, использующие солнечную энергию и производящие тепло, сопрягаются с энергетически невыгодными реакциями, увеличивающими степень биологической не-

упорядоченности. Рассмотрим более подробно, как достигается такое связывание.

Прежде всего следует более внимательно отнестись к выражению «энергетически выгодная» реакция, которым до сих пор мы пользовались слишком свободно. Как уже указывалось выше, спонтанно могут протекать только те реакции, в результате которых неупорядоченность во Вселенной увеличивается. Неупорядоченность возрастает в том случае, когда энергия выделяется в виде тепла; критерием увеличения неупорядоченности может служить величина, называемая **свободной энергией G.** Эта величина определяется таким образом, что ее изменение, обозначаемое ΔG, устанавливает меру неупорядоченности, возникающей во Вселенной в результате реакции (схема 2-7). По определению «энергетически выгодными» являются те реакции, при протекании которых высвобождается большое количество *свободной энергии;* иначе говоря, такие реакции отличаются большой *отрицательной* величиной ΔG и создают большую степень неупорядоченности. Такие реакции обладают ярко выраженной тенденцией к спонтанному протеканию, хотя скорость этих реакций будет зависеть и от других факторов, в частности от наличия специфических ферментов (см. ниже). И наоборот, реакции, в которых ΔG имеет *положительное* значение (например, реакция образования пептидной связи между двумя аминокислотами), повышают упорядоченность Вселенной и не могут протекать самопроизвольно. Такие энергетически невыгодные реакции происходят лишь в тех случаях, когда они связаны с другими реакциями, обладающими столь большими отрицательными значениями ΔG, что и ΔG всего процесса становится отрицательным.

Ход большинства реакций может быть количественно предсказан. Известно много термодинамических параметров, исходя из которых можно рассчитать изменения свободной энергии ΔG для большинства важных метаболических реакций клетки. Общее изменение свободной энергии при функционировании того или иного метаболического пути будет при этом выражаться как сумма изменений энергии на каждом из этапов этого пути. Рассмотрим две реакции:

А $\rightarrow$ В и В $\rightarrow$ Г,

значения ΔG которых равны соответственно +1 и — 13 ккал/моль. (Напомним, что один моль вещества содержит 6 x 10^{23} молекул.) В случае когда эти реакции сопряжены друг с другом, ΔG сопряженной реакции будет равно — 12 ккал/моль. Из этого следует, что энергетически невыгодная реакция А $\rightarrow$ Б, которая не может протекать спонтанно, может быть обусловлена энергетически выгодной реакцией В $\rightarrow$ Г при условии, что существует механизм, обеспечивающий сопряжение этих двух реакций.

2.4.2. Реакции биосинтеза зачастую непосредственно сопряжены с гидролизом АТР

Представим себе типичный биосинтетический процесс, при котором два мономера - А и Б - должны соединиться друг с другом в реакции *дегидратации* (называемой также *конденсацией),* сопровождающейся выделением воды:

А-Н + Б-ОН $\rightarrow$ А-Б + H_2O.

Обратная реакция (называемая *гидролизом),* в которой молекула воды разрушает ковалентно связанное соединение А-Б, почти всегда будет энергетически выгодной. Это имеет место, например, при гидро-

ВАЖНОСТЬ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ДЛЯ КЛЕТОК

Жизнь существует благодаря наличию сложной сети взаимосвязанных химических реакций, протекающих в клетке. Рассматривая реакционные пути, входящие в состав такой метаболической сети, читатель может подумать, что у клетки имеется возможность осуществить любую необходимую ей реакцию, "задействовав" определенный фермент. Однако это не так. Хотя ферменты и являются мощными катализаторами, они могут ускорять лишь реакции, разрешенные с точки зрения термодинамики, другие реакции могут протекать в клетке только тогда, когда они *сопряжены* с энергетически выгодными реакциями. Будет ли реакция протекать самопроизвольно или для ее осуществления необходимо сопряжение с другими реакциями? Это основной вопрос биологии клетки.

Ответ на него можно получить, выяснив значение величины, называемой ***свободной энергией:*** суммарное изменение свободной энергии в результате серии реакций определяет возможность протекания этой последовательности реакций. На данной схеме будут объяснены основные принципы (они рассматриваются в специальном разделе физики и химии, называемом **термодинамикой)**, необходимые для того, чтобы понять, что же такое свободная энергия и почему она столь важна для клеток.

ЭНЕРГИЯ, ВЫДЕЛЯЮЩАЯСЯ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ, ПРЕВРАЩАЕТСЯ В ТЕПЛО



Замкнутую *систему* можно определить как совокупность молекул, которые не обмениваются веществом с остальной частью Вселенной (например, рассмотренная раньше (рис. 2-11} и представленная на рисунке вверху "клетка в ящике"). Любая подобная система содержит молекулы, полная энергия которых равна Е. Эта энергия может существовать в различных формах: часть ее представлена энергией поступательного , вращательного и колебательного движения молекул, другая, большая часть, приходится на энергию связей между отдельными атомами, входящими в состав молекул. **Первый закон термодинамики накладывает ограничение на типы реакций, которые могут протекать в системе: согласно этому закону, "при любом процессе общее количество энергии Вселенной остается постоянным".** Представим себе, что в замкнутой системе протекает реакция А — В, сопровождающаяся выдалением большого количества энергии (речь идет об энергии химических связей). Сначала за счет этой энергии увеличится интенсивность движения молекул системы (поступательного, вращательного и колебательного) , что равнозначно повышению ее температуры. Однако затем эта энергия будет отводиться из системы вследствие молекулярных столкновений, что приведет к нагреванию сначала стенок ящика, а затем и внешнего окружения *(в* нашем примере это океан). В конце концов, когда вся энергия химических связей, выделившаяся в ящике, превратится в тепловую энергию и перейдет из ящика в океан, температура системы вернется к исходному значению. Согласно первому закону термодинамики, изменение энергии внутри ящика (мы будем обозначать его ΔE) должно быть равно по величине и противоположно по знаку количеству отведенной тепловой энергии (которую мы обозначим *h),* иначе говоря $\Delta E = -h$. Таким образом, энергия внутри ящика уменьшается, когда система отдает теплоту.

В процессе реакции *Е* может также измениться вследствие того, что над внешним окружением производится работа. Предположим, например, что в течение реакции объем ящика немного увеличивается (на величину ΔV . Поскольку для увеличения объема ящика его стенки должны раздвигаться при постоянном внешнем давлении *(Р),* такой процесс сопровождается совершением работы над внешней средой и требует затрат энергии. Эта энергия равна $P(\Delta V)$, и в соответствии с первым законом термодинамики, энергия внутри ящика (5) должна уменьшиться на ту же величину. В большинстве реакций энергия химических связей переходит как в работу, так и в тепло. Энтальпия *(Н)* - это сложная функция, зависящая от обеих этих величин $(H = E + PV)$. Строго говоря, для замкнутой системы именно изменение энтальпии (ΔH), а не энергии, равно количеству теплоты, отданному во внешнее окружение в процессе реакции. При реакциях, сопровождающихся уменьшением *Н,* тепло отдается во внешнюю среду, и такие реакции называются "экзотермическими", те реакции, при которых *Н* возрастает (и тепло поглощается извне), называются "эндотермическими". Таким образом, $-h = \Delta H$. Однако, поскольку изменением объема в большинстве биологических реакций можно пренебречь, вполне хорошим приближением будет следующее равенство:

$$-h = \Delta H = \Delta E$$

ВТОРОЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ

Рассмотрим ящик, в котором имеется 1000 монет, причем все они лежат "орлом" вверх. Если энергично встряхнуть ящик, монеты приходят в беспорядочное движение, сходное с движением молекул под действием непрерывных столкновений друг с другом. В конце концов около половины всех монет окажутся лежащими "решкой" вверх. Причина подобной переориентации состоит в следующем: существует лишь единственная возможность для того, чтобы монеты вернулись в исходное состояние (т. е. "орлом" вверх), в то время как состояние, при котором примерно равные количества монет обращены вверх "орлом" и "решкой", может быть достигнуто множеством различных способов (порядка 10^{298}). На самом деле состояние, при котором соотношение "орлов" и "решек" равно 50:50, достигается наибольшим числом способов по сравнению с любым другим состоянием, Для каждого состояния имеется вероятность его реализации, пропорциональная числу способов, которыми это состояние может быть достигнуто. **Второй закон термодинамики гласит, что "самопроизвольно система переходит из менее вероятного состояния в более вероятное.** Поскольку менее вероятные состояния являются более "упорядоченными", чем состояния более вероятные, второй закон термодинамики может быть сформулирован следующим образом: "непрерывные изменения во Вселенной переводят ее в более неупорядоченное состояние".

Схема 2-7. Свободная энергия и биологические реакции.

ЭНТРОПИЯ, S

Второй закон термодинамики позволяет предсказывать *направление* протекания конкретной реакции (однако этого нельзя сказать о первом законе). Но, чтобы закон можно было применять с указанной целью, необходимо иметь подходящую меру вероятности состояния, или, другими словами, показатель степени его неупорядоченности. Такой мерой служит энтропия (*S).* Она представляет собой логарифмическую функцию вероятности и определяется следующим образом: изменение энтропии (Δ S) в результате реакции Δ B, в ходе которой один моль вещества А превращается в один моль вещества В, равно

$$\Delta S = R \cdot \ln p_B / p_A$$

где p_A и p_B — вероятности состояний А и В; R — газовая постоянная (R =2 кал • град$^{-1}$ • моль$^{-1}$), a S измеряется в энтропийных единицах (э. ед.). В нашем примере с монетами вероятность состояния А (все монеты "орлом" вверх) относительно вероятности состояния В (половина монет вверх "орлом", половина — вверх "решкой") равно отношению чисел различных способов, которыми может быть реализовано каждое из этих двух состояний. Из расчетов следует, что $p_A = 1$, а $p_в$ = 1000! (500! x 500!) = 10^{298}. Таким образом, при энергичном встряхивании ящика, в результате которого монеты располагаются так, что вверх обращено равное количество "орлов" и "решек", изменение энтропии составляет *R* • ln(10^{289}), или примерно 1370 э. ед. на моль таких монеток (6 • 10^{23} монет). Теперь мы видим, что поскольку для перехода из состояния А в состояние В найденное выше значение энтропии положительно ($p_B/p_A > 1$), реакции, характеризующиеся большим увеличением S (т. е. те, для которых $\Delta S > 0$), являются благоприятными и будут протекать спонтанно.

В основном тексте говорилось о том, что тепловая энергия увеличивает хаотичность движения и расположения молекул. Переход тепла из замкнутой системы во внешнюю среду приводит к возрастанию числа различных состояний, в которых могут находиться молекулы, следовательно, повышается и энтропия внешней среды. Можно показать, что эффект возрастания неупорядоченности вследствие выделения определенного количества тепловой энергии значительнее при низких температурах, чем при высоких, и что, кроме того, определенное выше значение AS внешней среды (ΔS_{OK}) в точности равно отношению количества теплоты, перешедшей из системы в океан (h), к абсолютной температуре (Т) :

$$\Delta S_{океана} = h / T$$

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ГИББСА, G

При рассмотрении замкнутой биологической системы хотелось бы иметь возможность легко предугадать, будет ли данная реакция протекать самопроизвольно. Мы уже видели, что критическим моментом в этом отношении является ответ на следующий вопрос: положительно или отрицательно изменение энтропии Вселенной при осуществлении реакции? В нашей идеальной системе (клетка в ящике) имеется два отдельных вклада в изменение энтропии Вселенной — изменение энтропии системы, заключенной в ящик, и изменение энтропии окружающего ящик океана, — и прежде, чем делать какие-либо прогнозы, следует учесть оба эти вклада. Например, в процессе реакции может поглощаться тепло, что уменьшает энтропию океана (ΔS_{OK}< 01, но в то же время вызванное реакцией возрастание степени неупорядоченности внутри ящика может быть столь велико $\Delta S_{ящика}>0$), что суммарная величина $\Delta S_{Вселенной}$ ($\Delta S_{Вселенной} = \Delta S_{океана} + \Delta S_{ящика}$), будет больше 0. В этом случае реакция будет протекать самопроизвольно, несмотря на то что в ходе реакции теплота поглощается ящиком из моря. Примером подобной реакции может служить растворение хлористого натрия в мензурке с водой ("ящик"), которая представляет собой спонтанный процесс, хотя температура воды понижается при переходе соли в раствор.

Химики ввели ряд новых, по их мнению, полезных "сложных функций" (функций от функций), с помощью которых можно описать совокупность физических свойств системы. К характеристикам, использующимся для комплексной оценки системы, относятся температура (*Т*), давление *(Р),* объем (*V*), энергия (*Е*) и энтропия (*S*) . Энтальпия *(Н)* представляет собой одну из таких сложных функций. Но наиболее важной сложной функцией для биологов является свободная энергия Гиббса (*G*) С ее помощью можно сделать выводы об изменении энтропии вселенной в результате протекания химической реакции в ящике, не прибегая для этого к нахождению изменения энтропии океана. Для ящика объемом *V,* находящегося под давлением *Р, G* определяется из уравнения

$$G = H - TS$$

где *Н* — рассмотренная ранее энтальпия *(Е + PV), Т* — абсолютная температура, S — энтропия. Каждая из этих величин относится лишь к внутреннему пространству ящика. Изменение свободной энергии в результате химической реакции в ящике *(G* продуктов реакции минус G исходных соединений) обозначается ΔG и, как мы сейчас покажем, представляет собой непосредственную меру неупорядоченности, возникающей во Вселенной при осуществлении реакции.

При постоянной температуре изменение свободной энергии (ΔG) в процессе реакции равно Δ - *T*ΔS. Учитывая, что $\Delta H = -h$ и теплота поглощаются из океана, имеем

$$-\Delta G = -\Delta H + T\Delta S,$$
$$-\Delta G = h + T\Delta S \text{ и } -\Delta G/T = h/T + \Delta S.$$

Но h/T равно изменению энтропии океана $\Delta S_{океана}$), а ΔS в верхнем уравнении представляет собой $\Delta S_{ящика}$. Таким образом.

$$-\Delta G/T = \Delta S_{океана} + \Delta S_{ящика} = \Delta S_{Вселенной}$$

Это означает, что мы можем определить направление протекания реакции в соответствии со следующим условием: вызываемое реакцией изменение свободной энергии (ΔG) должно быть меньше нуля, поскольку в этом случае изменение энтропии Вселенной будет положительным. Таким образом, изменение свободной энергии является прямым показателем изменения энтропии Вселенной.

Для сложной совокупности сопряженных реакций, в которых участвует большое число различных молекул, полное изменение свободной энергии может быть рассчитано с помощью простого суммирования значений свободной энергии молекул различных видов после реакции и сравнения этой величины с суммарной свободной энергией перед реакцией; таблицы значений свободной энергии для наиболее распространенных соединений приводятся в литературе. С помощью указанного способа можно предсказать направление протекания реакции и посредством этого опровергнуть какой-либо ошибочный гипотетический механизм. Так, например, по полученным значениям величины электрохимического протонного градиента во внутренней митохондриальной мембране и по значению ΔG гидролиза АТР в митохондрии можно, убедиться в том, что для синтеза АТР, катализируемого ферментом АТР-синтетазой, необходимо, чтобы через мембрану проходило более одного протона на каждую молекулу АТР.

Значение ΔG реакции является непосредственным показателем степени смещения равновесия реакции. Большая отрицательная величина ΔG гидролиза АТР в клетке просто отражает тот факт, что гидролиз АТР в клетке поддерживается на таком уровне, что реакция смещена от равновесия на 10 порядков. Если достигнуто равновесное протекание реакции, ΔG = O, реакция будет в равной степени проходить в прямом и обратном направлении. Для гидролиза АТР равновесие достигается тогда, когда подавляющая часть молекул АТР уже гидролизована; такая ситуация имеет место в мертвой клетке.

литическом расщеплении белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов на субъединицы.

Общая стратегия, обеспечивающая образование клеткой А-Б из А-Н и Б-ОН, включает в себя многоступенчатую последовательность реакций, в результате которых происходит сопряжение энергетически невыгодного синтеза требуемых соединений со сбалансированной выгодной реакцией (рис. 2-17). Гидролизу АТР соответствует большая отрицательная величина ΔG (рис. 2-26), поэтому гидролиз АТР часто играет роль энергетически благоприятной реакции, благодаря которой осуществляются внутриклеточные реакции биосинтеза. На пути от А-Н и Б-ОН к А-Б, сопряженном с гидролизом АТР, энергия гидролиза сначала переводит Б-ОН в промежуточное высокоэнергетическое соединение, которое затем непосредственно реагирует с А-Н, образуя А-Б. Простейший механизм данного процесса включает в себя перенос фосфата от АТР к Б-ОН с образованием Б-ОРО$_3$ (или Б-О-Ⓟ), причем в этом случае суммарная реакция осуществляется всего лишь в две стадии:

1. Б-ОН + АТР $\rightarrow$ Б-О-Ⓟ + ADP,

2. А-Н + Б-О-Ⓟ $\rightarrow$ А-Б + Pi.

Поскольку образующееся промежуточное соединение Б-О-Ⓟ затем вновь разрушается, суммарные реакции можно описать с помощью следующих уравнений:

А-Н + Б-ОН $\rightarrow$ А-Б и АТР $\rightarrow$ ADP + *Pi*.

Первая, энергетически невыгодная реакция оказывается возможной благодаря тому, что она сопряжена со второй, энергетически выгодной реакцией (гидролиз АТР). Примером сопряженных биосинтетических реакций подобного типа служит синтез аминокислоты глутамина (рис. 2-27).

Величина ΔG гидролиза АТР до ADP и неорганического фосфата зависит от концентрации всех реагирующих веществ и при обычных для клетки условиях лежит в пределах от —11 до —13 ккал/моль (см. разд. 7.1.10). Реакция гидролиза АТР в принципе может быть использо-

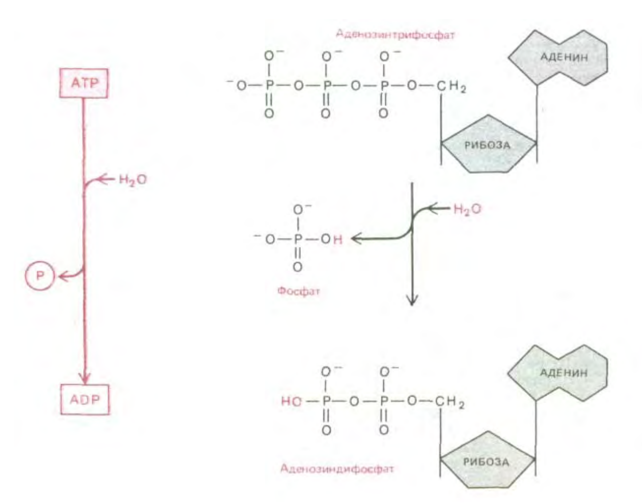


Рис. 2-26. При гидролизе АТР может отщепляться концевой фосфат, при этом выделяется полезная энергия, количество которой составляет в зависимости от внутриклеточных условий от 11 до 13 ккал/моль. Большая отрицательная величина ΔG данной реакции обусловлена рядом факторов. Вследствие отщепления концевого фосфата исчезает энергетически невыгодное электростатическое отталкивание между соседними отрицательными зарядами. Кроме того, высвобождающийся неорганический фосфат-ион стабилизируется благодаря резонансу и образованию энергетически выгодных водородных связей с водой.

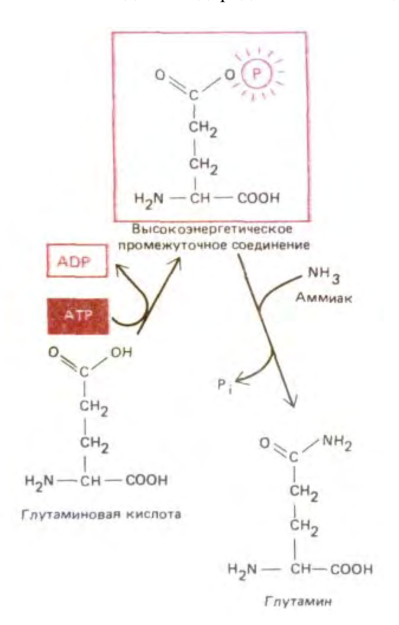


Рис. 2-27. Пример биосинтетической реакции дегидратации, запускаемой гидролизом АТР. Глутаминовая кислота сначала превращается в высокоэнергетическое фосфорилированное промежуточное соединение (соответствует соединению Б-О-Р в тексте), которое затем реагирует с аммиаком с образованием глутамина. В данном примере обе реакции осуществляются на поверхности одного и того же фермента - *глутаматсинтетазы.* Отметим, что обе молекулы для простоты представлены в незаряженной форме.

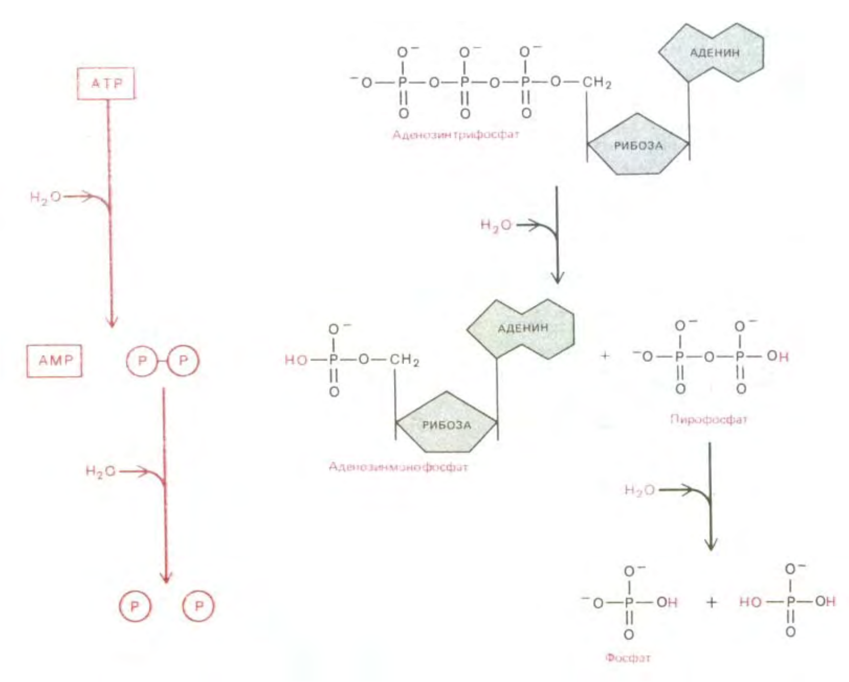


Рис. 2-28. Другой путь гидролиза АТР: сначала образуется пирофосфат, который затем подвергается гидролизу. На этом пути выделяется почти вдвое больше энергии, чем в реакциях, рассматриваемых на рис. 2-26. Показано, что атомы Н, извлеченные из воды, после гидролиза присоединяются к фосфатным группам. Однако при значениях рН, характерных для цитоплазмы, большая часть этих атомов отделяется, образуя свободный ион водорода (H^+).

вана для осуществления термодинамически невыгодной реакции со значением ΔG, равным, скажем, + 10 ккал/моль, при наличии, конечно, соответствующей последовательности реакций. Однако для многих реакций биосинтеза оказывается недостаточным даже ΔG = —13 ккал/моль. В этих и других случаях путь гидролиза АТР изменяется таким образом, что сначала образуются AMP и PPj (пирофосфат) (рис. 2-28). На следующей стадии пирофосфат также подвергается гидролизу; общее изменение свободной энергии всего процесса составляет примерно — 26 ккал/моль.

Каким образом энергия гидролиза пирофосфата используется в биосинтетических реакциях? Один путь можно продемонстрировать на приведенном выше примере синтеза соединения А-Б из А-Н и Б-ОН. С помощью соответствующего фермента Б-ОН может вступить в реакцию с АТР и превратиться в высокоэнергетическое соединение Б-О-Ⓟ-Ⓟ. Теперь реакция состоит из трех стадий:

1. Б-ОН + АТР $\rightarrow$ Б-О-Ⓟ-Ⓟ + AMP,
2. А-Н + Б-О-Ⓟ-Ⓟ $\rightarrow$ А-Б + PPi,
3. PPi + H_2O $\rightarrow$ 2Pi.

Суммарную реакцию можно представить в следующем виде: А-Н + Б-ОН $\rightarrow$ А-Б и АТР + H_2O $\rightarrow$ AMP + 2Pi.

Поскольку фермент всегда ускоряет катализируемую им реакцию как в прямом, так и в обратном направлении, соединение А-Б может распадаться, реагируя с пирофосфатом (реакция, обратная стадии 2). Однако энергетически выгодная реакция гидролиза пирофосфата (стадия

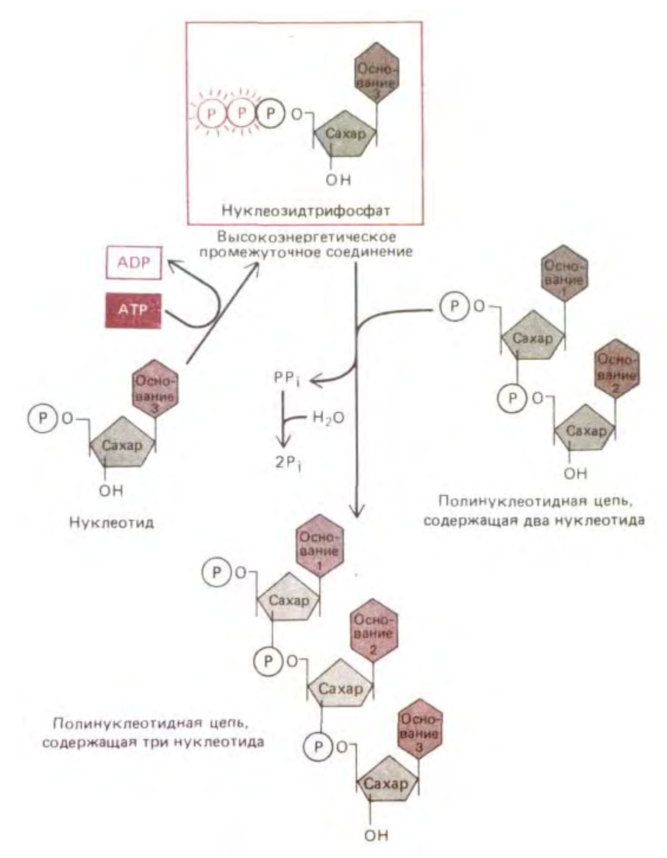


Рис. 2-29. Синтез полинуклеотида (РНК или ДНК) представляет собой многоступенчатый процесс, протекающий благодаря гидролизу АТР. На первом этапе нуклеозидмонофосфат (например, СМР) переходит в активированное состояние путем последовательного присоединения концевых фосфатов с двух молекул АТР. Образующееся высокоэнергетическое промежуточное соединение - нуклеозидтрифосфат, например СТР, - находится в свободном состоянии в растворе до тех пор, пока он не вступит в реакцию с концевым участком растущей цепи РНК или ДНК; в ходе реакции высвобождается пирофосфат. Энергетически крайне выгодный гидролиз последнего с образованием неорганического фосфата способствует тому, что весь процесс протекает в направлении синтеза полинуклеотида.

3) способствует поддержанию стабильности соединения А-Б за счет того, что концентрация пирофосфата остается очень низкой (это предотвращает протекание реакции, обратной реакции 2). Таким образом, энергия гидролиза пирофосфата обеспечивает протекание реакции в прямом направлении. Пример важной биосинтетической реакции указанного типа (синтез полинуклеотида) представлен на рис. 2-29.

2.4.3. Коферменты участвуют в переносе специфических химических групп

Поскольку концевая фосфатная связь АТР легко расщепляется с выделением свободной энергии, это соединение служит эффективным источником фосфата для большого числа различных реакций фосфорилирования. Множество разнообразных, химически лабильных связей ведет себя подобным образом. Например, специфические молекулы-переносчики содержат ацетильные или метальные группы, связанные реактивными связями, что позволяет этим группам легко переходить на другие молекулы (табл. 2-2). Одна и та же молекула-переносчик нередко принимает участие во многих различных реакциях биосинтеза, для осуществления которых необходимо наличие ее специфической реакционноспособной группы.

Примером такой молекулы-переносчика может служить ацетил-кофермент А (ацетил-СоА), образующийся при расщеплении глюкозы. Он переносит ацетильную группу, присоединенную к СоА лабильной

Таблица 2-2. Некоторые коферменты, принимающие участие в реакциях переноса химических групп

Кофермент [1]	**Переносимая группа**
ATP	**Фосфатная**
NADH, NADPH	Водород + электрон (гидрид-ион)
Кофермент А	Ацетильная
Биотин	Карбоксильная
S-Аденозилметионин	Метильная

[1] Коферментами являются малые молекулы, связанные с некоторыми ферментами и необходимые для проявления их активности. Каждый из перечисленных коферментов представляет собой молекулу-переносчик для небольшой химической группы и участвует в различных реакциях, в которых эта группа переносится на другую молекулу. Некоторые коферменты присоединяются к ферментам с помощью ковалентных связей, другие связаны с ними менее прочно. Ковалентно связанные коферменты иногда называют *простетическими группами* ферментов.

тиоэфирной связью (рис. 2-19). Эта ацетильная группа легко переходит на другую молекулу, такую, например, как молекула жирной кислоты. Другой заслуживающий внимания пример - это *биотип,* осуществляющий во многих реакциях биосинтеза перенос карбоксильной группы (рис. 2-30). Молекулы, подобные ацетил-СоА, биотину и АТР, называются **коферментами,** так как они тесно связаны с поверхностями различных ферментов и необходимы для проявления ферментативной активности. Многие коферменты не могут синтезироваться животными и должны поступать в организм с пищей (из растений и микроорганизмов). *Витамины* - важнейшие факторы питания, необходимые животным в следовых количествах - часто являются предшественниками требующихся коферментов.

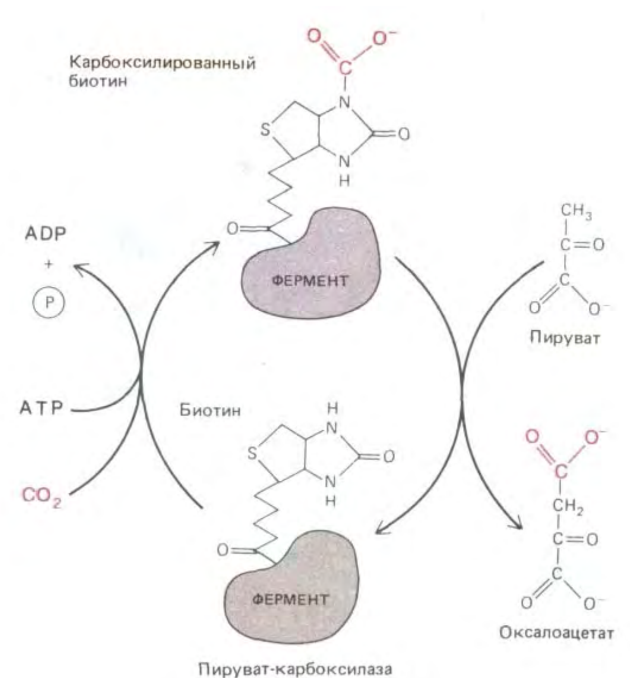


Рис. 2-30. Перенос карбоксильной группы коферментом биотином. Биотин играет роль молекулы-переносчика карбоксильной группы (— COO^-). В показанной последовательности реакций биотин ковалентно связан с ферментом пируват-карбоксилазой. Активированная карбоксильная группа, происходящая из бикарбонат-иона (HCO_3^-), связывается с биотином в реакции, протекающей за счет энергии гидролиза ATP. Затем гидроксильная группа переносится к метильной группе пирувата с образованием оксалоацетата.

2.4.4. Для биосинтеза необходимы восстановительные эквиваленты

Мы уже видели, что в клетке непрерывно протекают реакции окисления и восстановления. Химическая энергия, заключенная в молекулах питательных веществ, высвобождается в ходе окислительных процессов, тогда как для построения биологических молекул клетка нуждается, кроме всего прочего, в осуществлении ряда восстановительных реакций, протекающих с затратой химической энергии. Ранее рассмотренный нами принцип сопряженных реакций обеспечивает клеткам возможность непосредственного использования химической энергии катаболизма для синтеза NADH (см. рис. 2-21). Затем высокоэнергетическая связь между водородом и никотинамидным кольцом в молекуле NADH снабжает энергией другие термодинамически невыгодные ферментативные реакции, в которых водород (в виде гидрид-иона) переносится на другую молекулу. Поэтому NADH и легко образующийся из него NADPH называют носителями «восстановительной силы».

Чтобы понять, как это происходит на деле, рассмотрим лишь одну ступень биосинтеза - последнюю реакцию в синтезе липидной молекулы *холестерола*. В этой реакции два атома водорода присоединяются к полициклическому стероидному кольцу, восстанавливая двойную связь углерод—углерод (рис. 2-31). Как и в большинстве реакций биосинтеза, два атома водорода, необходимые для данной реакции, поставляются в виде гидрид-иона молекулы NADPH и протона (H^+) из раствора ($H^+ + H^- = 2H$). Как и в случае NADH, гидрид-ион, который должен переноситься от NADPH, входит в состав никотинамидного кольца и легко отщепляется от него, поскольку никотинамидное кольцо становится при этом ароматическим, достигая таким образом наиболее стабильного состояния (см. рис. 2-22). Следовательно, как в NADH, так и в NADPH гидрид-ион присоединен высокоэнергетической связью, при разрыве которой он может быть перенесен на другую молекулу при условии, что имеется подходящий фермент, способный катализировать этот переход.

В химическом отношении различие между NADH и NADPH незначительно: NADPH имеет дополнительную фосфатную группу в той части молекулы, которая удалена от ее активной области (рис. 2-32). В самой реакции эта фосфатная группа не участвует. Однако она служит как бы «рукояткой», с помощью которой NADPH в качестве кофермента связывается с соответствующими ферментами. NADH, как правило, работает с ферментами, катализирующими катаболические реакции, тогда как NADPH взаимодействует с ферментами биосинтеза. Следова-

Рис. 2-31. Последний этап одного из путей биосинтеза холестерола. Восстановление связи С—С происходит в результате переноса на нее гидрид-иона с молекулы-переносчика NADPH и протона (H^+) из раствора.

Рис. 2-32. Строение NADPH, отличающегося от NADH (рис. 2-22) только наличием дополнительной фосфатной группы, благодаря которой определенные ферменты (обычно участвующие в процессах биосинтеза) избирательно узнают это соединение.

тельно, катаболические и биосинтетические пути могут регулироваться независимо друг от друга путем изменения количества NADH и NADPH соответственно.

2.4.5. Синтез биологических полимеров осуществляется путем повторения элементарных реакций дегидратации

Основными макромолекулами, синтезируемыми клетками, являются полинуклеотиды (ДНК и РНК), полисахариды и белки. Эти макромолекулы необычайно разнообразны по структуре и представляют собой наиболее сложные из известных молекул. Несмотря на это, они синтезируются из относительно небольшого числа малых молекул (называемых *мономерами* или *субъединицами)* с помощью ограниченного набора химических реакций.

Присоединение мономеров к белкам, полинуклеотидам и полисахаридам крайне упрощенно показано на рис. 2-33. Хотя в реакциях синтеза каждого полимера участвуют ковалентные связи разных типов, а также различные ферменты и кофакторы, тем не менее все эти реакции обнаруживают сильное сходство. Присоединение мономеров в каждом случае происходит путем реакции дегидратации - удаления молекулы воды из состава реагирующих соединений.

Как в обсуждавшемся ранее более общем случае (см. разд. 2.4.2), для

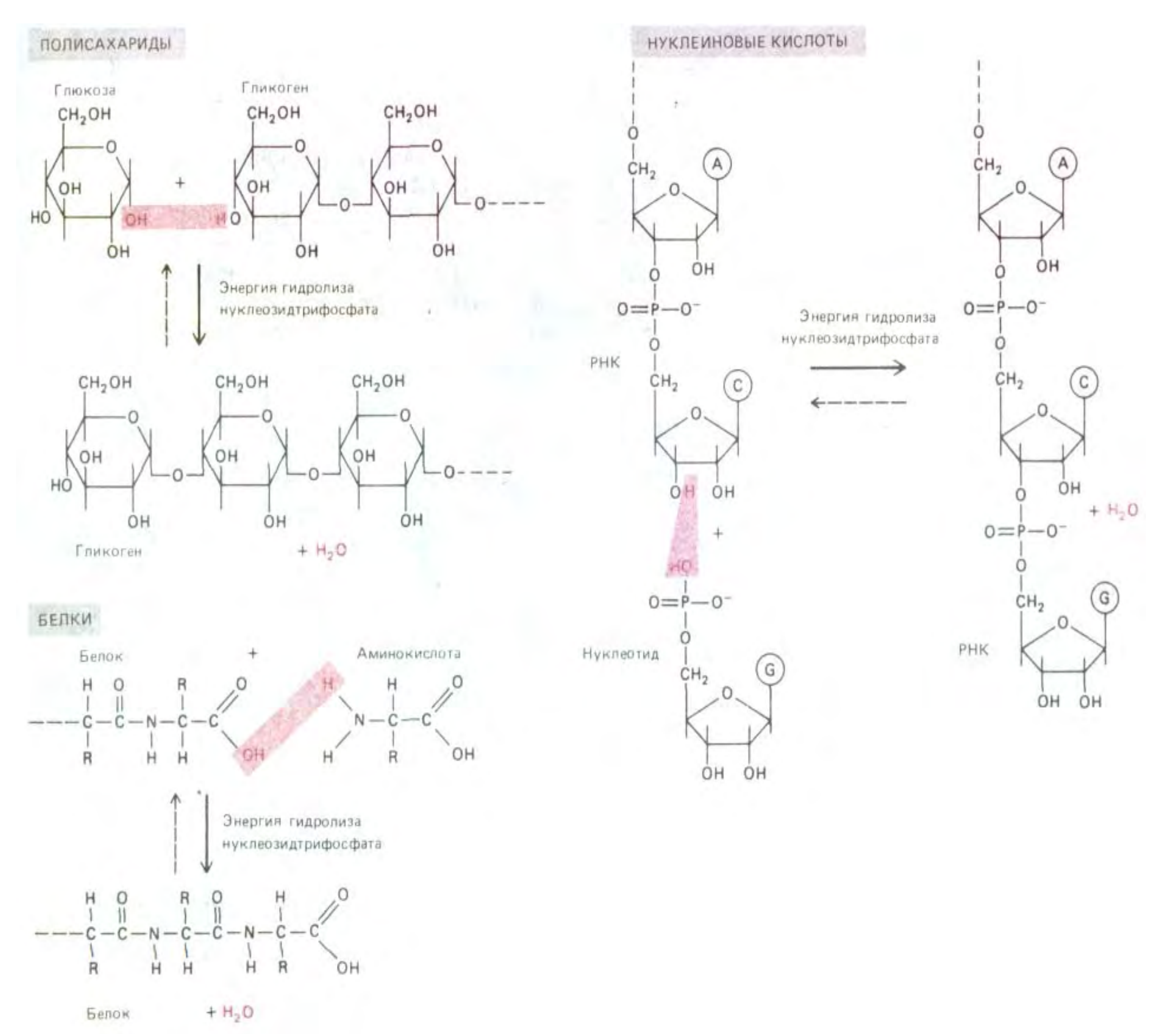


Рис. 2-33. Схематическое изображение реакций полимеризации, приводящих к синтезу биологических полимеров трех типов. В каждом случае при синтезе происходит потеря молекулы воды (дегидратация). На рисунке не отражен тот факт, что перед присоединением каждого из мономеров последние должны быть активированы высокоэнергетическими нуклеозидтрифосфатами. Обратная реакция - распад полимеров всех трех типов осуществляется путем простого присоединения молекул воды (гидролиз).

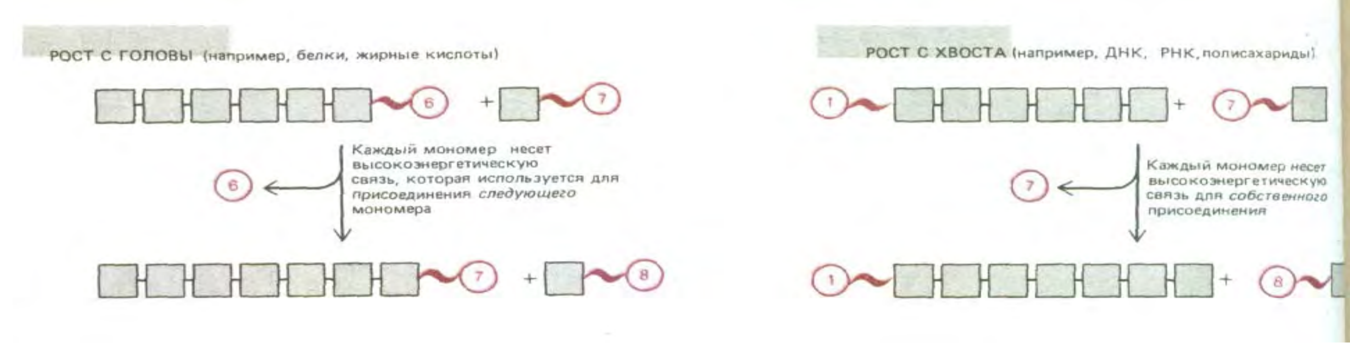


Рис. 2-34. Рост полимеров с головы и с хвоста.

образования указанных полимеров требуется химическая энергия, обеспечиваемая в конечном счете обычным путем сопряжения реакции биосинтеза с энергетически выгодной реакцией гидролиза нуклеозидтрифосфата. Для всех трех типов макромолекул по крайней мере один и: вовлеченных в процесс нуклеозидтрифосфатов расщепляется с образованием пирофосфата, который в дальнейшем в свою очередь гидролизуется, поставляя дополнительное количество необходимой для реакции энергии (рис. 2-29).

Активированные промежуточные продукты реакций полимеризации могут быть ориентированы двояко, обусловливая полимеризацию либо «с хвоста», либо «с головы». При *полимеризации «с головы»* активированная связь находится на конце растущего полимера и, следовательно, должна регенерировать при каждом присоединении мономера В этом случае каждый мономер приносит с собой активированную группу, которая будет использована в реакции со следующим мономером данной последовательности (рис. 2-34). При *полимеризации «с хвоста»* активированная связь, которую несет с собой каждый новый мономер, будет использована для присоединения этого мономера. Для синтеза биополимеров используются оба типа полимеризации. В то время как синтез полинуклеотидов и некоторых простых полисахаридов происходит путем полимеризации «с хвоста», синтез белков осуществляется посредством полимеризации «с головы».

Заключение

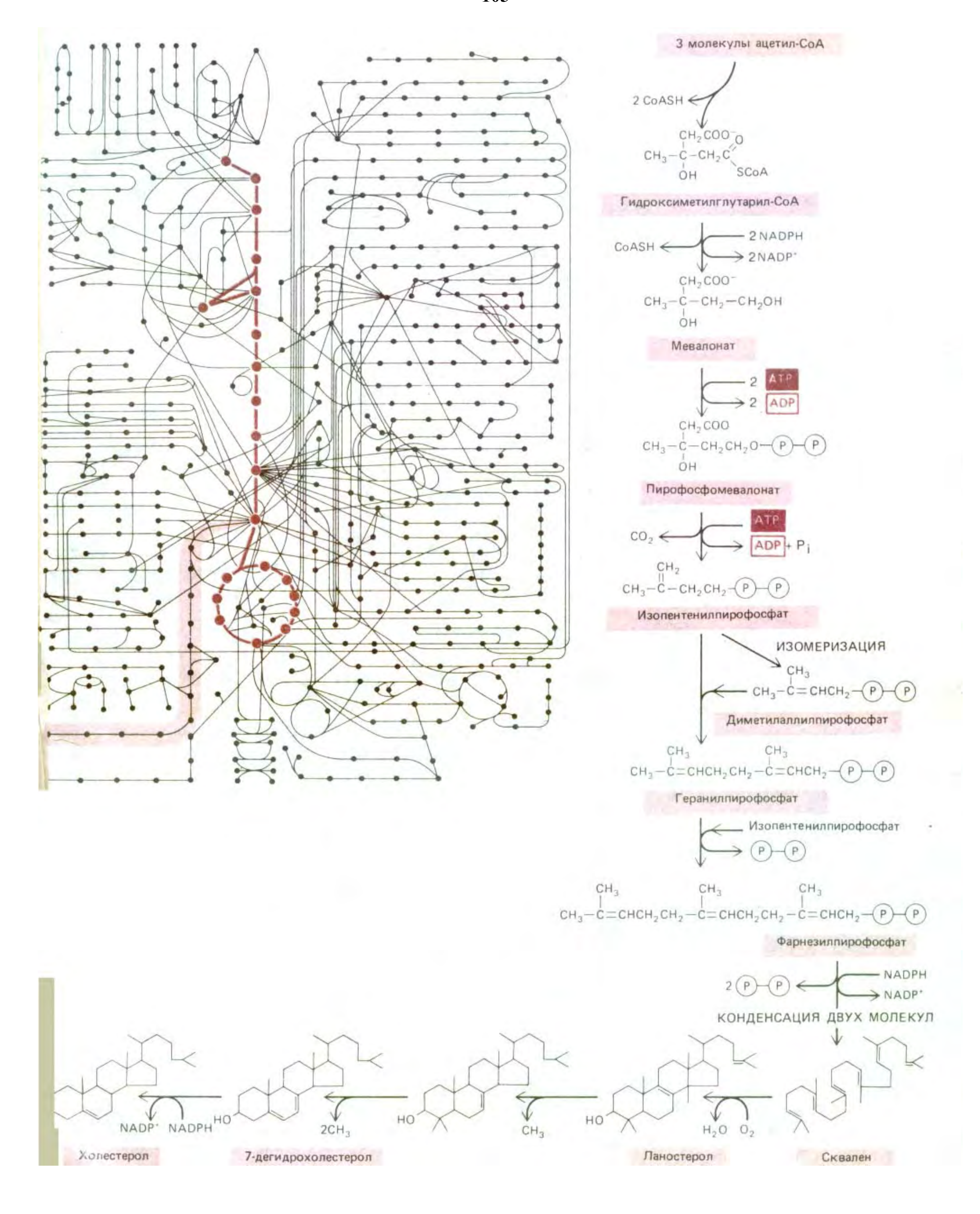
Гидролиз АТР обычно сопряжен с энергетически невыгодными реакциями, такими, как биосинтез макромолекул, осуществляемый путем образования фосфорилированных промежуточных продуктов. Другие реакционноспособные молекулы-переносчики, называемые коферментами, переносят в ходе биосинтеза иные химические группы; например, NADPH переносит водород - в виде протона и двух электронов (гидрид-ион), а ацетил-СоА переносит ацетильные группы. Молекулы полимеров, такие, как белки и нуклеиновые кислоты, собираются из небольших активированных молекул-предшественников путем многократного повторения реакций дегидратации.

2.5. Координация катаболизма и биосинтеза [19]

2.5.1. Метаболизм - организуемый и регулируемый процесс

Некоторое представление о том, насколько мудро сконструирована клетка, если рассматривать ее как химическую машину, можно получить из рис. 2-35, где приведена карта, содержащая лишь часть всех метабо-

Рис. 2-35. Некоторые из химических реакций, протекающих в клетке. *А.* Около 500 общих метаболических реакций расходятся в разных направлениях от гликолитического пути и цикла лимонной кислоты (показаны более темной краской). Каждая химическая реакция представлена в виде сплошного кружка. Типичная клетка млекопитающего синтезирует более 10000 белков, большая часть которых - ферменты. На произвольно выбранном участке (выделен более светлой краской) этого сложного переплетения метаболических путей происходит синтез холестерола из ацетил-СоА. Справа и внизу от «лабиринта» этот участок показан более детально в увеличенном масштабе *(Б).* →



3 молекулы ацетил-CoA
2 CoASH
Гидроксиметилглутарил-CoA
CoASH
2 NADPH
2 NADP⁺
Мевалонат
2 ATP
2 ADP
Пирофосфомевалонат
CO2
ATP
ADP + Pi
Изопентенилпирофосфат
ИЗОМЕРИЗАЦИЯ
Диметилаллилпирофосфат
Геранилпирофосфат
Изопентенилпирофосфат
Фарнезилпирофосфат
NADPH
NADP⁺
КОНДЕНСАЦИЯ ДВУХ МОЛЕКУЛ
Холестерол
7-дегидрохолестерол
Ланостерол
Сквален

лических путей. Все эти многочисленные реакции происходят в клетке диаметр которой не превышает 0,1 мм, причем для каждой реакции требуются различные ферменты, которые сами являются продуктам целого ряда реакций переноса информации и синтеза белка. Возьмем любую малую молекулу, например аминокислоту *серин;* найдется с пол дюжины или более ферментов, способных химически видоизменять ее различными путями. Серин может связываться с АМР (аденилирование на стадии, предшествующей его включению в синтез белков, или расщепляться до глицина, или превращаться в пируват, прежде чем быть окисленным; он может быть ацетилирован с помощью ацетил-СоА или перенесен на жирную кислоту с образованием фосфатидилсерина. Все эти различные пути конкурируют за одну и ту же молекулу серина причем в это же время идет аналогичная конкурентная борьба за тысячи других малых молекул. Можно подумать, что система в целом нуждается в столь тонкой балансировке, что любое незначительное нарушение, например временное изменение рациона, приведет ее к гибели.

На самом же деле клетке присуща поразительная стабильность. При любых внешних воздействиях реакция клетки направлена на восстановление ее исходного состояния. Она может приспосабливаться и продолжать координированно функционировать во время голода или болезни. Мутации многих типов могут привести к элиминированию отдельных последовательностей реакций, и тем не менее клетка выживает при условии, что удовлетворяются определенные минимальные требования. Это возможно благодаря наличию сложной системы механизмов, регулирующих и координирующих химические реакции в клетках. Некоторые из более высоких уровней контроля рассматриваются в следующих главах. Здесь мы касаемся лишь простейших механизмов, которые регулируют поток малых молекул в различных метаболических путях клетки.

2.5.2. Метаболические пути регулируются изменениями ферментативной активности [20]

Концентрации различных малых молекул в клетке довольно устойчивы, что достигается **регуляцией по принципу обратной связи.** Регуляторные молекулы такого типа корректируют поток метаболитов по определенному метаболическому пути посредством временного увеличения или уменьшения активности ключевых ферментов. Например, первый фермент в той или иной последовательности реакций обычно ингибируется конечным продуктом этого метаболического пути по принципу *отрицательной обратной связи;* таким образом, если накапливается слишком много конечного продукта, дальнейшее поступление предшественников в данный метаболический путь автоматически ингибируется (рис. 2-36). В случае ветвления или пересечения метаболических путей, что происходит довольно часто, имеется, как правило, несколько точек, в которых осуществляется контроль различными конечными продуктами. Насколько важны такие процессы регуляции по принципу обратной связи, видно из рис. 2-37, где показана регуляция ферментативной активности в последовательностях реакций, ведущих к синтезу аминокислот.

Регуляция по принципу обратной связи может срабатывать почти мгновенно и является обратимой; кроме того, определенный конечный продукт может ингибировать ферменты, катализирующие его синтез, и при этом быть активатором ферментов другого метаболического пути Молекулярная основа такого типа контроля в клетках хорошо изучена, однако здесь мы данного вопроса касаться не будем, поскольку для

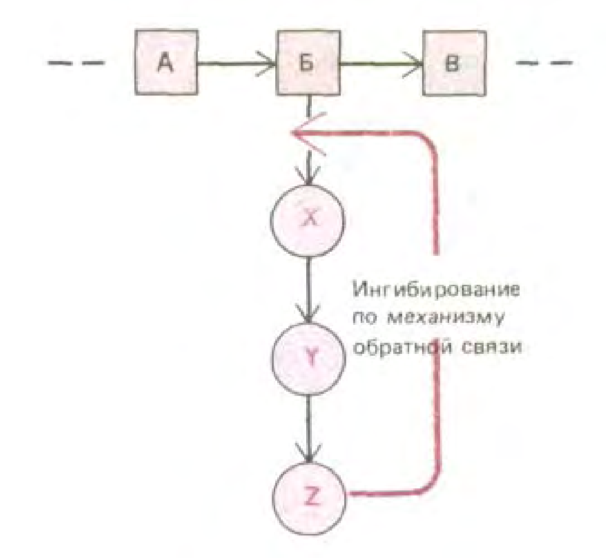


Рис. 2-36. Ингибирование по принципу обратной связи на одном биосинтетическом пути. Конечный продукт Z ингибирует первый фермент, необходимый для синтеза этого продукта, регулируя таким образом собственное содержание в клетке.

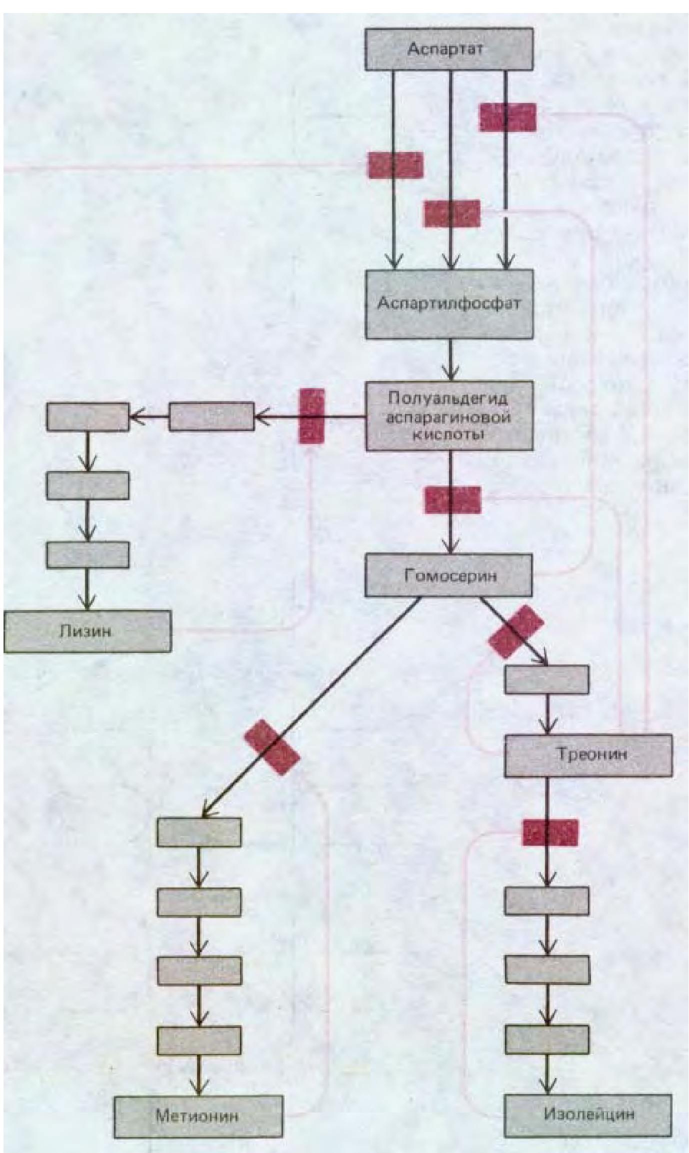


Рис. 2-37. Ингибирование по принципу обратной связи при синтезе аминокислот лизина, метионина, треонина и изолейцина у бактерий. Цветными стрелками показаны участки, в которых происходит ингибирование ферментов продуктами реакций. Отметим что начальную реакцию катализируют три различных фермента (называемые *изоферментами),* каждый из которых ингибируется своим конечным продуктом.

этого необходимо иметь представление о структуре белка. Поэтому мы отложим этот вопрос до гл. 3.

2.5.3. Катаболические реакции могут обращаться при поглощении энергии [21]

Крупномасштабные изменения, влияющие на метаболизм всей клетки, могут быть достигнуты регуляцией ключевых ферментов. Например, особая схема регуляции по принципу обратной связи позволяет клетке переключаться с расщепления глюкозы на ее биосинтез, или *глюконеогенез.* Потребность в таком обращении метаболического пути бывает особенно острой как в периоды напряженных тренировок, когда необходимая для мышечного сокращения глюкоза синтезируется в клетках печени, так и во время голодания, при котором глюкоза для выживания организма должна образовываться из жирных кислот и аминокислот. Обычный распад глюкозы до пирувата в процессе гликолиза катализируется несколькими различными последовательно действующими ферментами. Большинство реакций, катализируемых этими ферментами, легко обращается, однако три из них *(стадии 1, 3* и *9* на рис. 2-20) фактически необратимы. На самом деле процесс расщепления глюкозы

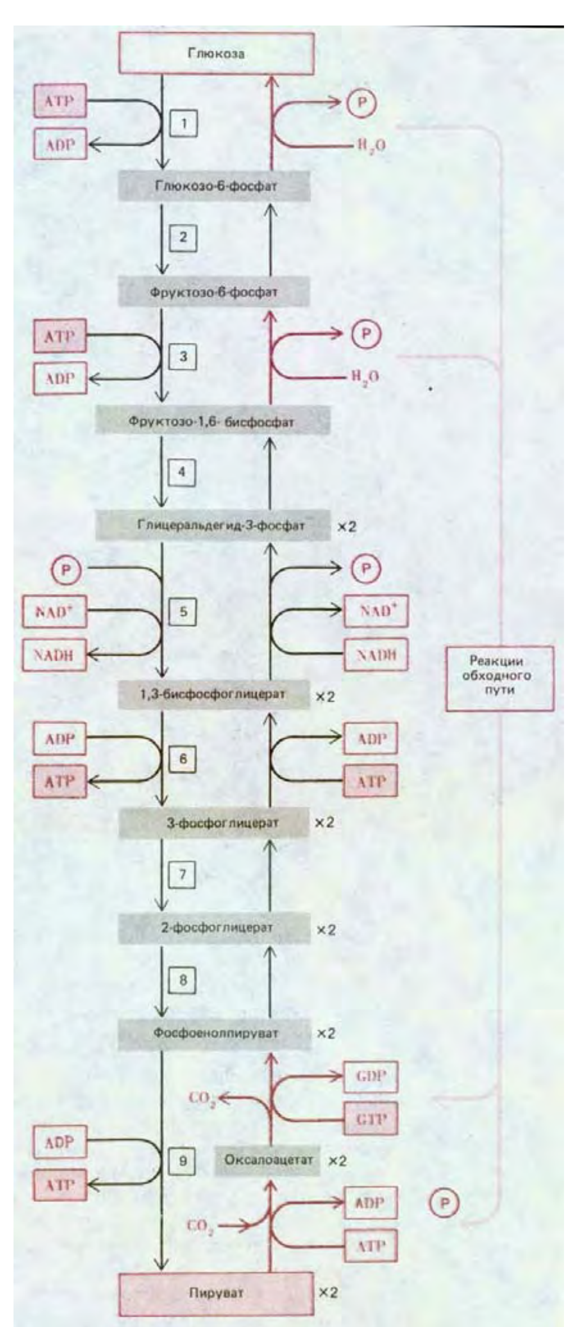


Рис. 2-38. Сравнение реакций, ведущих к синтезу глюкозы в процессе глюконеогенеза, с реакциями расщепления глюкозы в ходе гликолиза. Реакции расщепления глюкозы (гликолитические реакции) энергетически выгодны (изменение свободной энергии меньше нуля), тогда как реакции синтеза протекают с затратой энергии. Для синтеза глюкозы необходимы различные ферменты обходного пути, шунтирующие реакции 1, 3 и 9 гликолиза. Общее направление протекания реакций между глюкозой и пируватом определяется контрольными механизмами, действующими по принципу обратной связи на указанных трех ключевых стадиях.

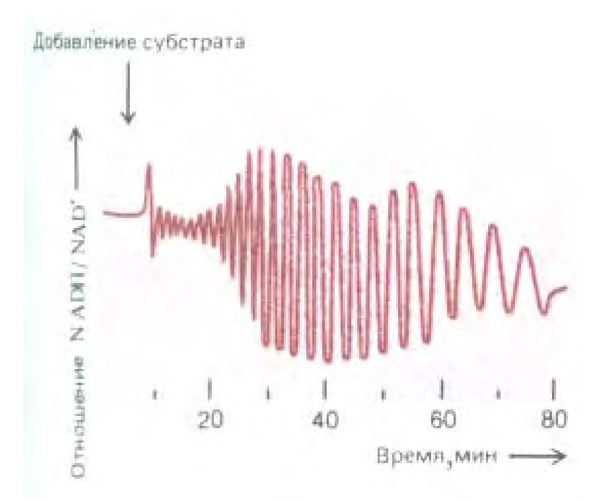


Рис. 2-39. Внезапное добавление глюкозы к экстракту, содержащему ферменты и коферменты гликолиза, может вызвать значительные флуктуации в концентрации определенных промежуточных продуктов, например NADH. Такие метаболические колебания могут быть, в частности, обусловлены регуляцией гликолитического фермента фосфофруктокиназы по принципу положительной обратной связи.

направляется обычно большим отрицательным изменением свободной энергии указанных реакций. Чтобы этот процесс протекал в противоположном направлении и происходило образование глюкозы из пирувата, вокруг каждой из этих реакций должен существовать обходной путь (шунт), причем реакции обходного пути должны идти «вверх» - процесс, происходящий с потреблением энергии (рис. 2-38). Таким образом, если при расщеплении одной молекулы глюкозы до двух молекул пирувата образуются две молекулы АТР, то для обращения реакции в процессе глюконеогенеза необходим гидролиз четырех молекул АТР и двух молекул GTP. Это эквивалентно гидролизу шести молекул АТР на каждую вновь синтезированную молекулу глюкозы.

Реакции обходного пути (рис. 2-38) должны жестко контролироваться, так чтобы глюкоза быстро расщеплялась в случае «энергетического голода», а синтезировалась тогда, когда клетка насыщена питательными веществами. Если бы прямые и обратные реакции могли протекать без ограничений, они впустую гоняли бы множество метаболитов туда и обратно через холостые циклы, потребляющие огромные количества АТР и бесполезно выделяющие тепло.

Изящество подобных механизмов контроля можно проиллюстрировать на одном примере. Этап 3 гликолиза представляет собой одну из реакций, которая должна быть шунтирована при образовании глюкозы. Обычно на этом этапе происходит присоединение к фруктозо-6-фосфату второй фосфатной группы из АТР; реакция катализируется ферментом *фосфофруктокиназой.* Этот фермент активируется АМР, ADP и неорганическим фосфатом, а ингибируется АТР, цитратом и жирными кислотами. Иначе говоря, фермент активируется, когда запасы энергии малы и накапливаются продукты распада АТР; инактивируется же он в том случае, когда имеются обильные запасы энергии (в форме АТР) либо питательных веществ в виде жирных кислот или цитрата (извлекаемого из аминокислот). Ферментом, катализирующим обращенную (обходную) реакцию (образование глюкозы в результате гидролиза фруктозо-1,6-бисфосфата до фруктозо-6-фосфата), является *фруктозобисфосфатаза.* Активность этого фермента регулируется по принципу обратной связи таким же образом, что и действие фосфофруктокиназы, но с противоположным эффектом, так что фруктозо-бисфосфатаза активна, когда неактивна фосфофруктокиназа.

Отметим, что фосфофруктокиназа активируется ADP, представляющим собой продукт катализируемой данным ферментом реакции (АТР + фруктозо-6-фосфат → ADP + фруктозе-1,6-бисфосфат), и ингибируется АТР - одним из субстратов этой реакции. В результате этот фермент может активировать сам себя, являясь объектом сложного контроля по принципу положительной обратной связи. При определенных условиях такой контроль по принципу обратной связи вызывает необычные колебания активности данного фермента, что приводит к соответствующим колебаниям концентраций различных промежуточных продуктов гликолиза (рис. 2-39). Физиологическое значение таких специфических колебаний неясно. Однако на их примере можно видеть, как благодаря нескольким ферментам может быть создан биологический осциллятор. Такие осцилляции в принципе могут служить своеобразными «внутренними часами», позволяющими клетке «отсчитывать время» и, к примеру, выполнять конкретные функции в определенные периоды.

2.5.4. Ферменты могут переходить в активное или неактивное состояние путем ковалентных модификаций [22]

Рассмотренные выше типы контроля по принципу обратной связи позволяют осуществлять непрерывную регуляцию скоростей протекания

метаболических последовательностей в ответ на ежесекундные флуктуации метаболизма. Кроме того, клетки обладают специальными регуляторными механизмами для ситуаций, в которых требуется продолжительное (от нескольких минут до нескольких часов) изменение активности ферментов. Такие механизмы включают в себя обратимые ковалентные модификации ферментов, которые часто (хотя и не всегда) достигаются присоединением фосфатной группы к специфическому (серии, треонин или тирозин) аминокислотному остатку фермента. Фосфат поступает от АТР, а его перенос катализируется ферментами, называемыми *протеинкиназами.*

В следующей главе мы рассмотрим вопрос о том, каким образом изменение формы фермента при фосфорилировании усиливает или подавляет его активность. Последующее удаление фосфатной группы, сводящее к нулю эффект фосфорилирования, достигается при помощи другого фермента, называемого *фосфопротеин-фосфатазой.* Ковалентная модификация ферментов - это регуляция в новом измерении, поскольку она делает возможной регуляцию специфических последовательностей реакций такими сигналами (например, гормонами), которые не являются промежуточными продуктами метаболизма.

2.5.5. Реакции компартментализованы как на уровне клеток, так и на уровне всего организма [23]

Не все метаболические реакции клетки протекают в одних и тех же субклеточных *компартментах* (обособленных субклеточных структурах). Поскольку различные ферменты находятся в разных компартментах клетки, поток химических компонентов направляется не только химическим, но и физическим путем.

Простейшая форма такого пространственного разобщения наблюдается, когда два фермента, катализирующие две последовательные реакции, образуют единый ферментный комплекс, и, следовательно, продукту первой ферментативной реакции не нужно диффундировать через цитоплазму, чтобы встретиться со вторым ферментом. Как только заканчивается первая реакция, сразу же начинается вторая. Некоторые крупные агрегаты ферментов осуществляют всю последовательность реакций, оставаясь в контакте с субстратом. Например, превращение пирувата в ацетил-СоА происходит в три этапа, каждый из которых протекает на одном и том же ферментном комплексе (рис. 2-40), а при синтезе жирной кислоты даже еще более длинная последовательность реакций катализируется единым ферментным ансамблем. Неудивительно, что некоторые из наиболее крупных ферментных комплексов ответственны за синтез макромолекул такого типа, как белки и ДНК.

На следующем уровне пространственного разобщения в клетке происходит концентрирование функционально связанных ферментов в одной и той же мембране или в ограниченных мембранами водим компартментах органелл. Проиллюстрировать это можно на примере метаболизма глюкозы (рис. 2-41). Образовавшийся в результате гликолиза пируват активно захватывается из цитозоля во внутренне пространство митохондрий, где имеются все ферменты и метаболиты цикла лимонной кислоты. Более того, сама внутренняя митохондриальная мембрана содержит все ферменты, катализирующие последовательные реакции окислительного фосфорилирования, включая реакции переноса электронов от NADH к O_2 и реакции синтеза АТР. Следовательно, всю митохондрию можно считать небольшим заводом, производящим АТР. Аналогичным образом другие клеточные органеллы, такие, например, как ядро, аппарат Гольджи и лизосомы, можно рассматривать как специализированные компартменты, в которые за-

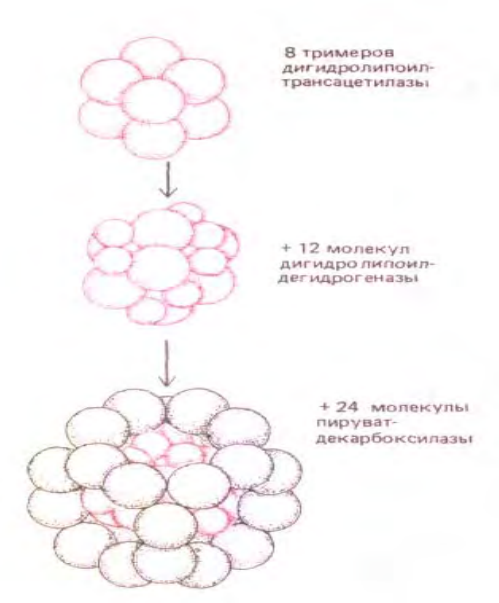


Рис. 2-40. Строение пируват-дегидрогеназы - крупного мультиферментного комплекса, в котором промежуточные продукты реакции переходят непосредственно от одного фермента к другому. Этот ферментный комплекс катализирует превращение пирувата в ацетил-СоА.

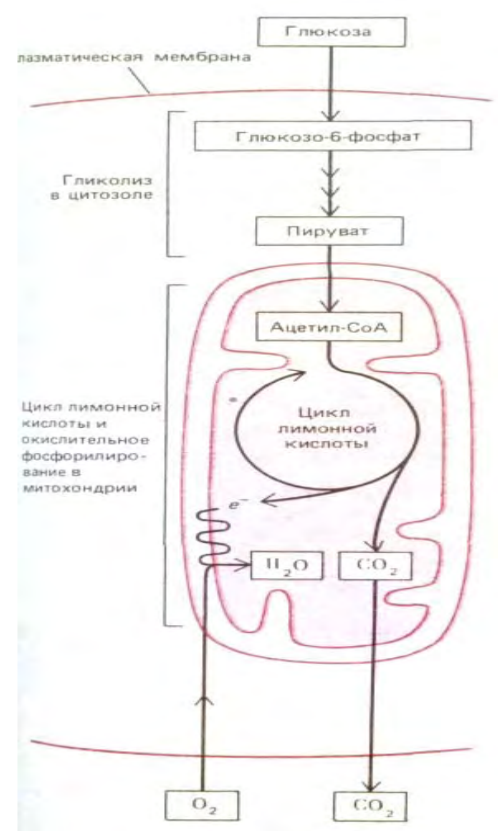


Рис. 2-41. Пространственное разобщение трех стадий расщепления глюкозы в эукариотической клетке. Гликолиз осуществляется в цитозоле, тогда как реакции цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования - только в митохондриях.

ключены функционально связанные ферменты для выполнения специальных задач. В определенном смысле живая клетка подобна современному городу со множеством специализированных служб, концентрирующихся в разных районах и связанных друг с другом при помощи обширной сети различных коммуникаций.

В многоклеточных организмах пространственная организация выходит далеко за пределы отдельной клетки. Различные ткани тела обладают разнообразным набором ферментов и по-разному способствуют выживанию организма. Кроме различий в специализированных продуктах, таких, как гормоны или антитела, между разными типами клеток одного и того же организма имеются еще и существенные различия в общих для всех клеток метаболических путях. Хотя фактически во всех клетках имеются ферменты гликолиза, цикла лимонной кислоты, синтеза и распада липидов и метаболизма аминокислот, уровни всех этих процессов по-разному регулируются в различных тканях. Нервные клетки, возможно, наиболее «привередливые» клетки организма, содержат крайне малые запасы гликогена или жирных кислот, целиком «полагаясь» на глюкозу, поставляемую с кровью. Клетки печени снабжают глюкозой клетки активно работающих мышц. Кроме того, они используют молочную кислоту, образованную в мышцах, для синтеза глюкозы (рис. 2-42). Клетки каждого типа обладают специфическими для них особенностями метаболизма и широко сотрудничают как в нормальном состоянии, так и при тренировках, стрессе или голодании.

Заключение

Тысячи и тысячи различных биохимических реакций, одновременно осуществляемых клеткой, тесно скоординированы между собой. Разнообразные механизмы контроля регулируют активность клеточных ферментов при изменении существующих в клетке условий. Наиболее общая форма регуляции - это легко обратимое ингибирование по принципу обратной связи, когда первый фермент метаболического пути ингибируется конечным продуктом этого пути. Более длительная форма регуляции включает в себя химическую модификацию одного фермента под действием другого, что часто происходит в результате фосфорилирования. Комбинации регуляторных механизмов могут вызывать сильные и длительные изменения в метаболизме клетки. Не все клеточные реакции происходят в одних и тех же внутриклеточных компартментах, и пространственное разграничение клетки внутренними мембранами позволяет органеллам осуществлять специализацию своих биохимических функций.

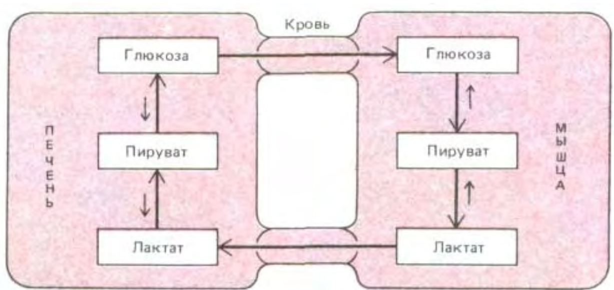


Рис. 2-42. Схематическое изображение метаболического взаимодействия между клетками печени и мышц. Основным «топливом» для клеток активно работающих мышц служит глюкоза, значительная часть которой поставляется клетками печени. Молочная кислота - конечный продукт анаэробного распада глюкозы в мышцах в процессе гликолиза - вновь превращается в глюкозу в ходе глюконеогенеза в печени.

Литература

Основная

Herriott J.; Jacobson G; Marmur J.; Parsom W. Papers in Biochemistry. Reading, MA: Addison-Wesley, 1984.
**Lehninger A.L.* Principles of Biochemistry. New York: Worth, 1982.
Stryer L. Biochemistry, 3rd ed. New York: W.H. Freeman, 1988.
Wood W.B.; Wilson J.H.; Benbow R.M.; Hood I.E. Biochemistry: A Problems Approach, 2nd ed. Menlo Park. CA: Benjamin-Cummings, 1981.

Цитируемая

1. *Henderson L.J.* The Fitness of the Environment. Boston: Beacon, 1927; reprinted 1958. (Классический анализ в доступном изложении.)
2. *Ingroham J. L.; Maaloe O.; Neidhardt F. C.* Growth of the Bacterial Cell. Sunderland, MA: Sinauer, 1983.
3. *Roehrig K. L.* Carbohydrate Biochemistry and Metabolism. Westport, CT: AUI Publishing, 1984.
Sharon N. Carbohydrates. Sci. Am**., 243(5**): 90-116, 1980.
4. *Robertson R. N.* The Lively Membranes. Cambridge, U. K.; Cambridge University Press, 1983.
5. *Saenger W.* Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer, 1984.
6. *Hess B.; Markus M.* Order and chaos in biochemistry. Trends Biochem. Sci. **12,:** 45-48, 1987.
Lehninger A.L. Bioenergetics: The Molecular Basis of Biological Energy Transformations. 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Commings, 1971.
***Schrodinger E.* What is Life? Mind and Matter. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press, 1969.
7. *Dickerson R.E.* Molecular Thermodynamics. Menlo Park. Ca.; Benjamin, 1969.
Klotz I. M. Energy Changes in Biochemical Reactions. New York: Academic Press, 1967.
8. *Raven P. H.; Evert R. H.; Eihhorn S. E.* Biology of Plants, 4th ed. New York: Worth, 1981.
9. *Racker E.* From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. Fed. Proc. **39:** 210-215, 1980.
10. *Fothergill-Gilmore L.A.* The evolution of the glicolitic pathway. Trends Biochem. Sci. 11: 47-51, 1986.
Shulman R.G. NMR Spectroscopy of living cells. Sci. Am. **248(1**): 86-93, 1983.
11. *Lipmann F.* Wanderings of a Biochemist. New York: Wiley, 1971.
12. *Schlenk F.* The ancestry, birth and adolescence of ATP. Trends Biochem. Sci. **12**: 367-368, 1987.
13. *McGilvery R. W.* Biochemistry: A Functional Approach, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1983.
Racker E. A. New Look at Mechanisms in Bioenergetics. New York: Academic Press, 1976.
14. *Kornberg H.L.* Tricarboxylic acid cycles. Bioessays 7: 236-238, 1987.
15. *Krebs H. A.* The history of the tricarboxylic acid cycle. Perspect. Biol. Med. **14:** 154-170, 1970.
Krebs H. A.; Martin A. Reminiscences and Reflections. Oxford, U. K.: Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 1981.
16. *Pullmann M. E.; at al.* Partial resolution of the ensymes catalyzing oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. **235**: 3322-3329, 1960.
17. *Prigogine I.; Stengers I.* Order out Chaos: Man's New Dialogue with Nature. New York: Bantam Books, 1984.
18. *Eisenberg D.; Crothers D.* Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1979.
Reich J. G.; Selkov E. E. Energy Metabolism of the Cell - A Theoretical Treatise. New York: Academic Press, 1981.
19. *Martin B.R.* Metabolic Regulation: A Molecular Approach. Oxford, U.K.; Blackwell Scientific, 1987.
****Newsholme E.A.; Start C.* Regulation in Metabolism. New York: Wiley, 1973.
20. *Pardee A. B.* Molecular basis of biological regulation: origins of feedback inhibition and allostery. Bioessays 2: 37-40, 1985.
21. *Hess B.* Oscillating reactions. Trends Biochem. Sci. **2:** 193-195, 1977.
22. *Cohen P.* Control of Enzyme Activity. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1983.

В русском переводе имеются следующие издания
*Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х томах. -М.: Мир. 1985.
**Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физика. Изд. 2-е. М., Атомиздат, 1972.
***Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир, 1977.

3. Макромолекулы: структура, форма и информационные функции

Макромолекулы клетки отличаются от ее малых молекул не только более крупными размерами. Белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды обладают уникальными и поистине поразительными свойствами, мало похожими на те, которые присущи их составляющим малым молекулам. Биологические макромолекулы построены из тысяч, иногда миллионов, атомов, собранных в точно детерминированную пространственную структуру. Каждая из этих макромолекул несет специфическую информацию, заключенную в их структуре. Ее можно рассматривать как серию биологических посланий, которые могут быть «прочитаны» при их взаимодействии с другими молекулами, что позволяет осуществить определенную функцию, необходимую для клетки.

В этой главе мы проанализируем структуру макромолекул, главным образом белков и нуклеиновых кислот, и попытаемся объяснить, как они в процессе эволюции приспособились к выполнению своих функций. Мы рассмотрим принципы, по которым эти молекулы катализируют химические превращения, строят сложные макромолекулярные структуры, осуществляют движение и (самое важное) хранят и передают наследственную информацию.

3.1. Процессы молекулярного узнавания [1]

Макромолекулы обычно имеют молекулярные массы от 10000 до 1 млн., т. е. по размеру такие молекулы занимают промежуточное положение между описанными в гл. 2 органическими молекулами и надмолекулярными структурами и органеллами, которые будут обсуждаться в последующих главах (рис. 3-1). Одна малая молекула, вода, составляет 75% общей массы клетки; почти всю остальную массу клетки составляют макромолекулы (табл. 3-1).

Как описано в гл. 2, макромолекулы собираются из низкомолекулярных субъединиц, которые, присоединяясь одна за другой, образуют длинную полимерную цепь (см. рис. 2-33). Обычно в построении каждой цепи участвуют лишь субъединицы одного семейства. Так, аминокислоты, связываясь с другими аминокислотами, образуют белки; нуклеотиды, связываясь с другими нуклеотидами, образуют нуклеиновые кислоты, а сахара, соединяясь с другими сахарами, формируют полисахариды. Поскольку для нормального функционирования макромолекулы решающее значение имеет точная последовательность субъединиц (мономеров), при биосинтезе макромолекул должны действовать механизмы, точно определяющие положение каждого мономера в цепи полимера.



Рис. 3-1. Сопоставление размеров белков с размерами других компонентов клетки. Рибосома представляет собой макромолекулярный комплекс, состоящий из примерно 60 белков и молекул РНК.

Таблица 3-1. Примерный химический состав типичной бактерии и типичной клетки млекопитающего

Доля от общей массы клетки, %

Компонент [1)]	**бактерия *E. coli***	**клетка млекопитающего**
H_2O	70	70
Неорганические ионы (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^- и т. п.)	1	1
Разнообразные низкомолекулярные метаболиты	3	3
Белки	15	18
РНК	6	1,1
ДНК	1	0,25
Фосфолипиды	2	3
Другие липиды	—	2
Полисахариды	2	2
Общий объем клетки	$2 \cdot 10^{-12}$ см^3	$4 \cdot 10^{-9}$ см^3
Относительный объем клетки	1	2000

[1)] Белки, полисахариды, ДНК и РНК - это макромолекулы. Липиды обычно не считают макромолекулами, хотя они и обладают некоторыми свойствами последних; например, большинство липидов синтезируется в виде линейных полимеров из молекул меньшего размера (ацетильной группы ацетилкофермента А) и путем самосборки образует более крупные структуры (мембраны).

3.1.1. Специфические взаимодействия макромолекулы зависят от слабых нековалентных связей [2]

Макромолекулярные цепи образуются с помощью ковалентных связей, которые достаточно прочны, чтобы поддерживать последовательность субъединиц макромолекулы в течение длительного времени. Но заключенная в этой последовательности информация выражается с помощью значительно более слабых нековалентных связей. Такие слабые связи возникают между разными частями одной и той же макромолекулы и между разными макромолекулами. В совокупности эти связи определяют и пространственную структуру макромолекулярных цепей, и то, как эти структуры взаимодействуют друг с другом.

Нековалентные связи в биологических молекулах обычно подразделяют на три типа: **ионные взаимодействия, водородные связи и вандерваальсовы взаимодействия.** Еще одно важное слабое взаимодействие создается пространственной структурой воды, которая стремится свести вместе гидрофобные группы и тем самым ослабить их разрушительное действие на сеть водородных связей молекул воды (схема 2-1). Такое выталкивание из водного раствора иногда считают четвертым типом слабой нековалентной связи. Все эти четыре типа слабых связей представлены на схеме 3-1.

В водном растворе каждая нековалентная связь в 30-300 раз слабее, чем типичные ковалентные связи, удерживающие вместе биологические молекулы (табл. 3-2) и лишь ненамного превышает среднюю энергию столкновения молекул, обусловленную тепловым движением при 37 °С. Одна нековалентная связь в отличие от одной ковалентной слишком слаба, чтобы противостоять тепловому движению, стремящемуся раз-

двинуть молекулы в разные стороны, поэтому, чтобы скрепить поверхности двух молекул требуется большое количество нековалентных связей. Большое число нековалентных связей может образоваться между двумя поверхностями только тогда, когда большое число атомов поверхностей точно соответствуют друг другу (рис. 3-2). Именно этим объясняется специфичность биологического узнавания, которое происходит, например, между ферментом и его субстратами.

Слабые нековалентные связи определяют, как различные участки одной молекулы располагаются друг относительно друга, кроме того, они определяют, как такая макромолекула взаимодействует с другими молекулами. Однако, как можно видеть в верхней части схемы 3-1, атомы ведут себя как твердые шары определенного радиуса («вандерваальсов радиус»). Невозможность взаимного перекрывания двух атомов ограничивает число пространственных расположений атомов (или конформаций), которые возможны для каждой полипептидной цепи. В принципе длинная подвижная цепь, такая, как молекула белка, может складываться огромным числом способов, при которых каждая кон-формация будет иметь разный набор слабых взаимодействий между цепями. Однако на деле большинство клеточных белков стабильно складывается только одним способом; в ходе эволюции была отобрана такая последовательность аминокислотных субъединиц, одна конформация которой способна образовывать значительно более благоприятные взаимодействия между цепями, чем любая другая.

3.1.2. Спираль является общим структурным элементом биологических молекул, построенных из повторяющихся субъединиц [3]

Биологические структуры часто образованы путем соединения похожих друг на друга субъединиц, таких как аминокислоты или нуклеотиды, в длинную повторяющуюся цепь (разд. 2.4.5). Если все субъединицы одинаковы, то соседние субъединицы в цепи будут соединены друг с другом только одним способом: их взаимное расположение будет таково, что энергия контакта между ними окажется минимальной. Каждая субъединица при этом расположена точно так же, как соседние, так что субъединица 3 будет входить в субъединицу 2, а субъединица 2 - в субъединицу 1 и т. д. Поскольку сборка субъединиц в виде прямой линии явление очень редкое, то обычно образуется **спираль** - регулярная структура, напоминающая винтовую лестницу, как показано на рис. 3-3. В зависимости от направления закручивания различают спирали правые и левые (рис. 3-4). Направление спирали не изменится, если спираль перевернуть, но изменится при зеркальном отражении.

Спирали весьма распространены среди биологических структур. Спирализации подвержены и молекулы, состоящие из субъединиц, соединенных ковалентными связями (ДНК), и большие белковые молекулы с нековалентными связями (актиновые нити). Это неудивительно: спираль возникает при простом накладывании друг на друга многих субъединиц, каждая из которых строго повторяет положение предыдущей.

3.1.3. Диффузия - первая стадия молекулярного узнавания [4]

Прежде чем связаться друг *с* другом, две молекулы должны прийти в соприкосновение. Это достигается путем теплового движения, вызывающего случайные перемещения, или *диффузию* молекул. Поскольку, находясь в жидкости, молекулы быстро сталкиваются и отскакивают

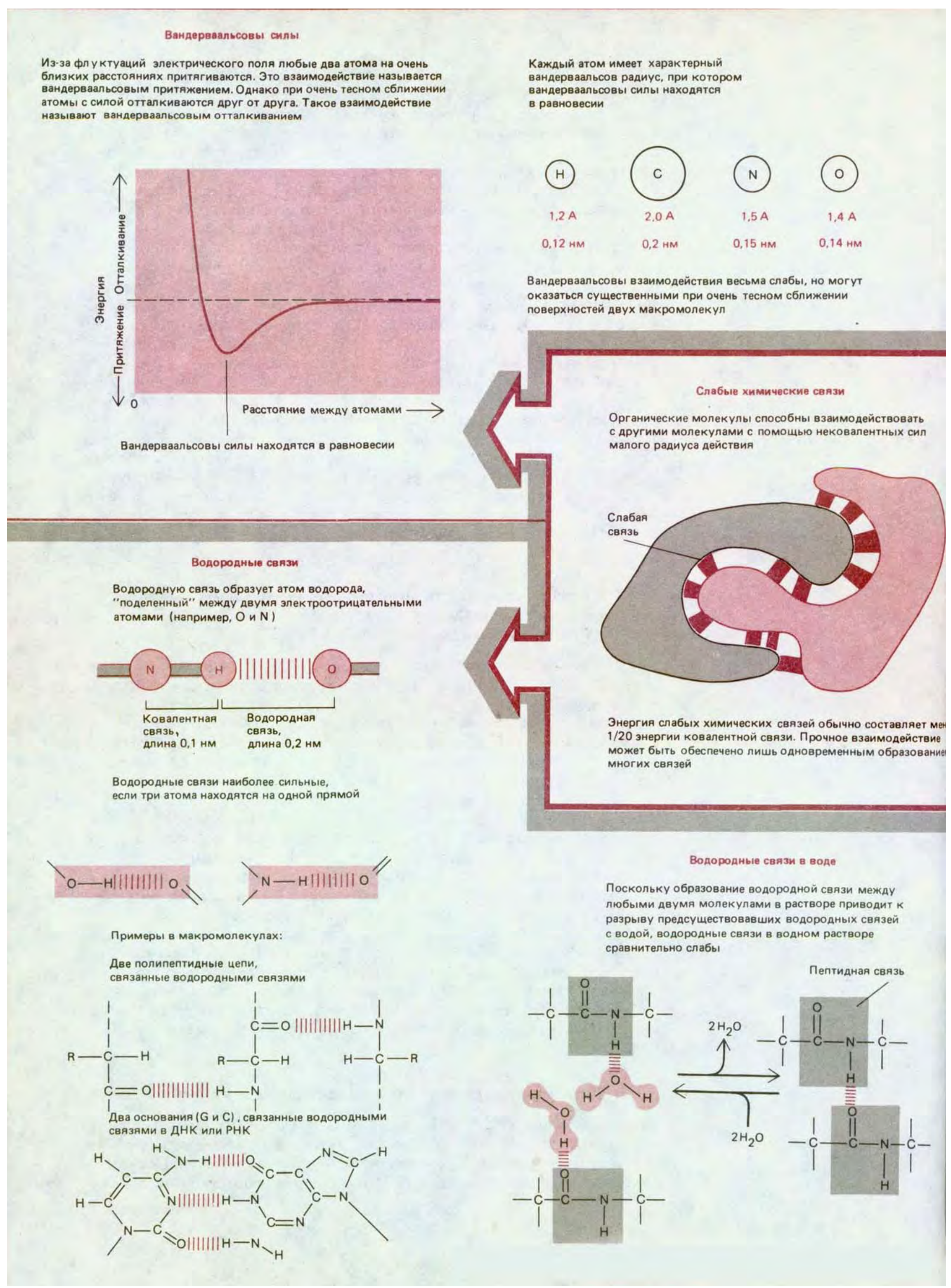
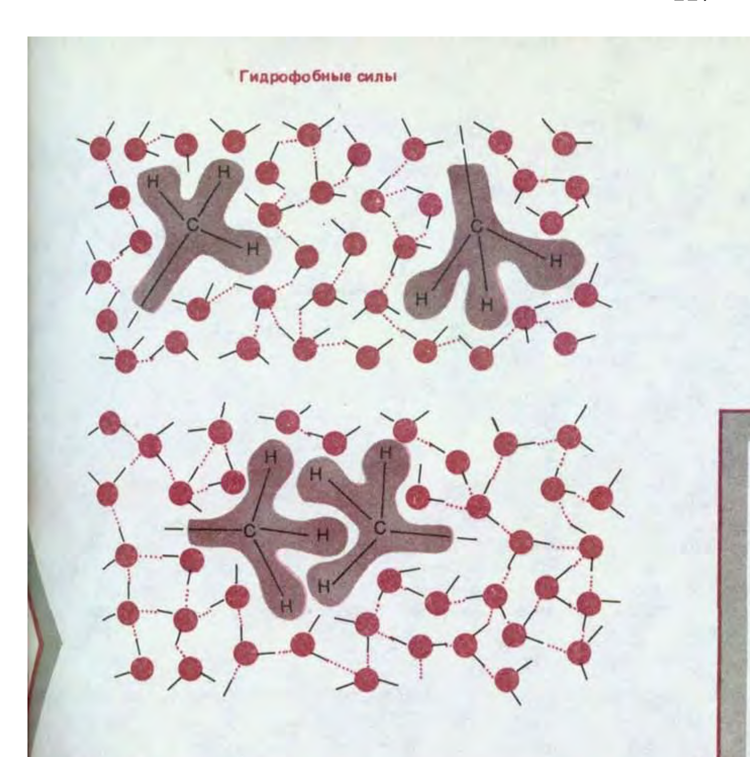


Схема 3-1. Основные типы слабых нековалентных связей, участвующих во взаимодействии макромолекул.

Гидрофобные силы

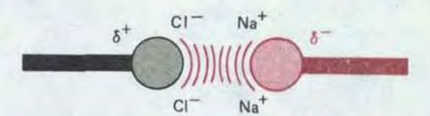


Гидрофобные группы нарушают структуру образованной водородными связями сети молекул воды. Чтобы уменьшить этот эффект, вода стремится объединить гидрофобные группы, про которые в таком случае говорят что они связаны гидрофобными взаимодействиями

Ионные взаимодействия в воде

В результате взаимодействия с молекулами воды заряженные группы экранируются, поэтому в водном растворе ионные связи сравнительно слабы (энергия равна примерно энергии водородной связи)

Ионные связи становятся более слабыми в присутствии солей, атомы которых образуют ионы противоположного заряда



Ионные связи

Ионные взаимодействия возникают между полностью заряженными группами (ионные связи) или между частично заряженными группами

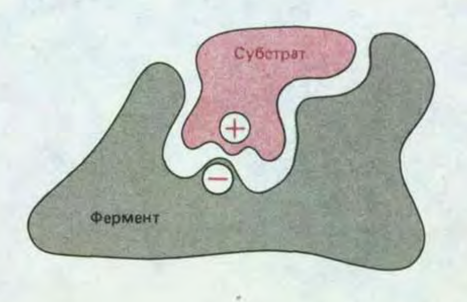


Сила притяжения между двумя зарядами δ^+ и δ^-:

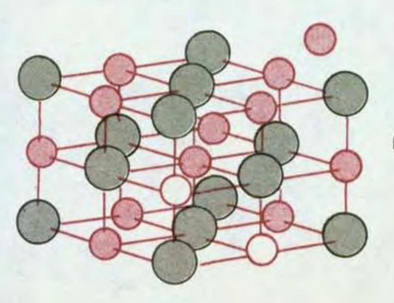
$$\text{Сила} = \frac{\delta^+\delta^-}{r^2 D} \text{ (закон Кулона)},$$

где D – диэлектрическая постоянная (1 для вакуума, 80 для воды), r – расстояние между зарядами

Тем не менее ионные связи играют важную роль; фермент, связывающий положительно заряженный субстрат, как правило, имеет в нужном месте отрицательно заряженную аминокислоту



В отсутствие воды ионные силы очень велики. Они обусловливают прочность многих минералов, например, мрамора и агата



Кристалл NaCl

Таблица 3-2. Ковалентные и нековалентные химические связи

Тип связи	Длина, нм	Энергия связи, ккал/моль [1]	
		в вакууме	**в воде**
Ковалентная	0,15	90	90
Ионная	0,25	80	1
Водородная	0,30	4	1
Вандерваальсова	0,20	0,1	0,1

[1] Энергию связи можно представить как энергию, необходимую для ее разрыва. Здесь она дана в килокалориях на моль (ккал/моль). Одна *килокалория* - это количество энергии, необходимое для повышения температуры 1000 г воды на 1°С. Широко используется и другая единица измерения -килоджоуль (кДж), равный 0,24 ккал. Индивидуальные связи значительно варьируют по силе в зависимости от конкретных атомов в микроокружении, так что приведенные величины могут служить лишь для грубой ориентировки. Обратите внимание на то, что водная среда клетки существенно ослабляет ионные и водородные связи между неводными молекулами.

друг от друга, индивидуальная молекула движется сначала В одну сторону, затем в другую, описывая «беспорядочную траекторию» (рис. 3-5). Среднее расстояние, пройденное такой молекулой, пропорционально квадратному корню времени. Иными словами, если перемещение некой молекулы на 1 мкм занимает в среднем 1 с, то перемещение на 2 мкм в среднем займет 4 с, а на 10 мкм - 100 с и т.д. Таким образом, диффузия - это эффективный способ перемещения молекул на ограниченные расстояния, но неэффективный для перемещения на большие расстояния.

В опытах с введением в клетки флуоресцентных красителей и других меченых молекул было установлено, что в цитоплазме малые молекулы диффундируют почти так же быстро, как в воде. Молекуле такого размера, как АТР, требуется лишь 0,2 с для диффузии в среднем на расстояние 10 мкм, что составляет диаметр небольшой клетки животного. Однако макромолекулы движутся значительно медленнее. Объясняется это не только тем, что им присуща меньшая скорость диффузии, но и тем, что их движение тормозится частыми столкновениями со многими другими макромолекулами, положение которых в цитоплазме фиксировано (рис. 3-6).

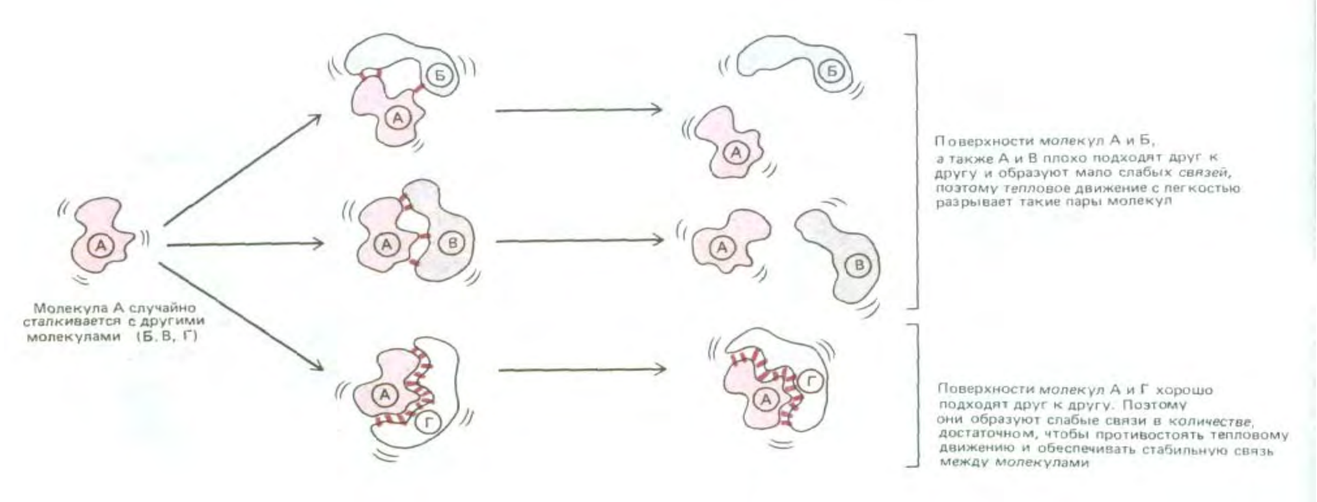


Рис. 3-2. Схема, иллюстрирующая, как макромолекулы узнают друг друга с помощью слабых взаимодействий.

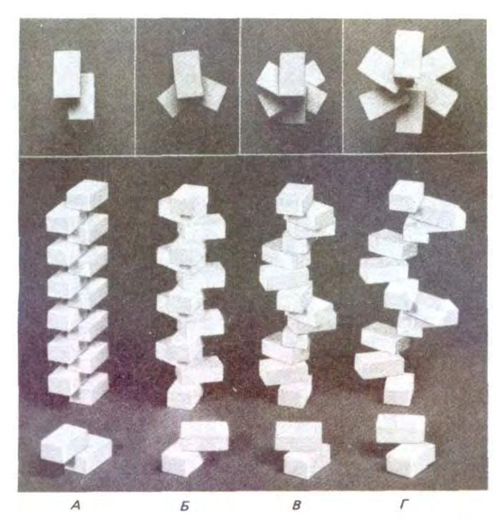


Рис. 3-3. Спираль образуется, когда серии субъединиц подстраиваются друг к другу регулярным образом. На переднем плане показано взаимодействие двух субъединиц, а сзади изображены спирали, получающиеся в результате этого взаимодействия. Эти спирали имеют две *(А),* три (Б) и шесть *(В и Г)* субъединиц на один оборот. В верхней части рисунка - вид спирали сверху. Обратите внимание, что спираль *Г* имеет более широкий шаг, чем *В*.

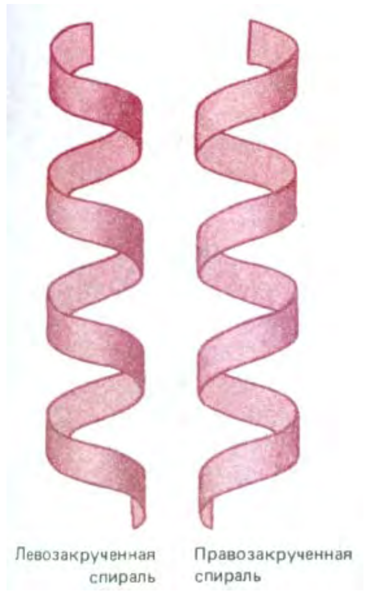


Рис. 3-4. Сравнение лево- и правозакрученной спиралей. Полезно вспомнить, что стандартный винт, который закручивается при вращении по часовой стрелке, является правозакрученным. Отметим, что спираль сохраняет закрученность, если ее перевернуть сверху вниз

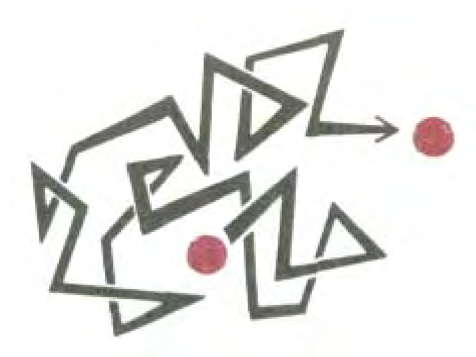


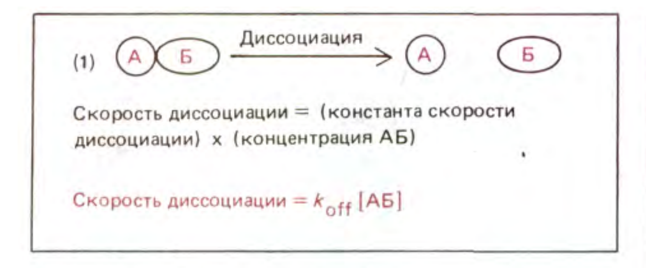
Рис. 3-5. Беспорядочное движение. Молекулы в растворе движутся случайным образом из-за постоянных столкновений с другими молекулами. Благодаря этому малые молекулы диффундируют из одной части клетки в другую за удивительно короткое время - менее чем за секунду.

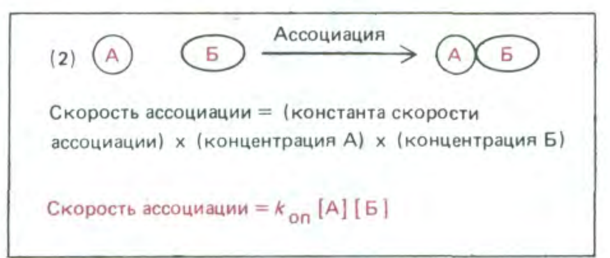


Рис. 3-6. Электронная микрофотография участка цитоплазмы животной клетки, иллюстрирующая высокую концентрацию содержащихся в ней белков. Макромолекулы в цитоплазме диффундируют относительно медленно, поскольку они взаимодействуют с другими макромолекулами; малые молекулы диффундируют почти столь же быстро, как в водном растворе. Клетка, представленная на этой микрофотографии, обработана по специальной методике быстрого замораживания, позволяющей сохранить цитоплазматические структуры. (Из P. C. Bridgman and T. S. Reese, J. Cell Biol. 99: 1655-1668, 1984. С разрешения Rockefeller University Press.)

3.1.4. Тепловое движение не только приводит молекулы в соприкосновение, но и отбрасывает их друг от друга [5]

Две макромолекулы или одна макромолекула и одна малая молекула, сталкиваясь в результате простой диффузии, образуют комплекс. Образование комплекса может произойти либо немедленно (в этом случае говорят, что скорость образования комплекса лимитируется диффузией), либо с некоторой задержкой, если взаимодействующие поверхности оказываются подогнанными друг к другу только после некоторой «подстройки» структуры одной или обеих молекул. В любом случае,





(3) В равновесии:

Скорость ассоциации = Скорость диссоциации

$$k_{on}[А][Б] = k_{off}[АБ]$$

$$\frac{[АБ]}{[А][Б]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = K = \text{константа равновесия}$$

Концентрация молекулы, представленной только одной копией в типичной клетке млекопитающего (объем 2000 мкм^3) составляет около 10^{-12} М.

Если такая клетка содержит 10^4 копий молекулы белка А и 10^6 копий молекулы белка Б,

$$[А] = 10^{-8}\ М \quad и \quad [Б] = 10^{-6}\ М$$

Предположим, что белок А связывается с белком Б с константой $K = 10^7\ М^{-1}$.
Отношение концентраций связанного и несвязанного белка А будет [АБ]/[А] и, следовательно,

$$\frac{[АБ]}{[А]} = K[Б] = (10^7 М^{-1})(10^{-6} М) = 10,$$

т. е. на каждые 10 молекул А, связанных с Б внутри клетки, будет приходиться одна свободная молекула А. Повторяя эти вычисления для $K = 10^4 М^{-1}$, получим, что только одна молекула А из ста будет связана с Б.

Рис. 3-7. Принцип равновесия. Равновесие между молекулами А и Б и комплексом АБ поддерживается двумя показанными на схемах / и 2, противоположно направленными реакциями. Отношение констант скоростей ассоциации и диссоциации (3) равно константе равновесия реакции *K*. Поскольку для того, чтобы прореагировать, молекулы А и Б в реакции *2* должны столкнуться, скорость этой реакции пропорциональна произведению концентраций А и Б. В результате в конечном выражении для *K* появляется произведение [А] • [Б] (квадратные скобки означают концентрацию). Принято, что концентрации продуктов ставятся в числитель, а концентрации реагентов - в знаменатель уравнения константы равновесия. Поэтому константа равновесия на схеме *3* относится к реакции ассоциации А + Б ⟶ АБ, а величина, обратная ей, будет константой равновесия для реакции диссоциации АБ ⟶ А + Б. Однако, когда мы имеем дело с простыми взаимодействиями связывания, правильнее говорить о константе сродства, или константе ассоциации, выражаемой в литрах на моль; чем больше величина константы ассоциации (K_a), тем сильнее связывание между А и Б. Обратной к K_a является константа диссоциации, выражаемая в молях на литр; чем меньше величина константы диссоциации K_d, тем сильнее связывание между А и Б.

Таблица 3-3. Соотношение между изменением свободной энергии и константой равновесия реакции *(К)*

$\frac{[АБ]}{[А][БА} = K$ (л/моль)	Свободная энергия АБ – Свободная энергия А + Б (ккал/моль)
10^5	-7,1
10^4	-5,7
10^3	-4,3
10^2	-2,8
10	-1,4
1	0
10^{-1}	1,4
10^{-2}	2,8
10^{-3}	4,3
10^{-4}	5,7
10^{-5}	7,1

Если реакция А + Б $\rightleftarrows$ АБ достигла равновесия, то относительные количества компонентов А, Б и АБ будут зависеть от разницы в их свободной энергии, AG°. Приведенные выше значения рассчитаны для 37°С с помощью уравнения

$$\Delta G^\circ = -RT\ln\frac{[АБ]}{[А]\cdot[Б]}$$

или

$$\frac{[АБ]}{[А]\cdot[Б]} = e^{-\Delta G^\circ/RT} = e^{-\Delta G^\circ(1,623)},$$

где ΔG^0 выражена в килокалориях на моль и представляет собой изменение свободной энергии данной реакции в стандартных условиях (концентрация всех компонентов составляет 1,0 моль/л).

если две взаимодействующие молекулы достаточно сблизились, они образуют множественные слабые связи, которые сохраняются до тех пор, пока случайное тепловое движение не вызовет снова диссоциацию молекул.

В общем случае, чем сильнее связывание молекул в комплексе, тем меньше скорость диссоциации. В предельном случае, когда энергия образовавшихся связей пренебрежимо мала по сравнению с энергией теплового движения, две молекулы диссоциируют сразу же после столкновения. В другом предельном случае энергия связей столь велика, что диссоциации практически не происходит. Таким образом, величина энергии взаимодействия - полезный показатель специфичности процесса узнавания.

Чтобы разобраться, как измеряют энергию взаимодействия, рассмотрим реакцию связывания молекулы А с молекулой Б. Эта реакция будет протекать до тех пор, пока не достигнет *положения равновесия,* при котором скорости образующихся и диссоциирующих комплексов равны. Используя равновесные концентрации молекул А, Б и комплекса АБ, можно определить **константу равновесия К** реакции (рис. 3-7). Эту константу иногда называют **константой сродства** и обычно используют в качестве меры силы связывания между двумя молекулами: чем сильнее связывание, тем выше значение константы сродства.

Константа равновесия реакции соединения двух молекул непосредственно связана с изменением в этой реакции стандартной свободной энергии ΔG°. Используя соответствующее уравнение (табл. 3-3), можно вычислить ΔG° для ряда значений *К.* Константы сродства реакций простого связывания в биологических системах обычно находятся в диапазоне от 10^3 до 10^{12} л/моль, что соответствует энергиям связывания от 4 до 17 ккал/моль, или возникновению в среднем от 4 до 17 водородных связей.

Самые сильные взаимодействия имеют место тогда, когда биологическая функция требует, чтобы две макромолекулы оставались тесно связанными в течение долгого времени, например, когда белок регуляторного гена связывается с ДНК, выключая ген (см. разд. 10.2.1). Самые слабые взаимодействия происходят, когда функция требует быстрого изменения в структуре комплекса, например, когда два взаимодействующих белка меняют партнеров при движениях белковой машины (см. разд. 1.3.1).

3.1.5. Атомы и молекулы находятся в постоянном движении [6]

Химические реакции в клетке происходят поразительно быстро. Например, типичная молекула фермента катализирует ~ 1000 реакций в секунду, а для некоторых ферментов эта величина может достигать более 10^6 реакций в секунду. Поскольку для каждой реакции требуется отдельное столкновение между ферментом и молекулой субстрата, такие скорости возможны только потому, что молекулы быстро перемещаются. Существует три типа молекулярных движений: 1) перемещение молекулы с одного места на другое (трансляционное движение), 2) быстрые колебания взад и вперед ковалентно связанных атомов друг относительно друга (вибрации) и 3) вращения. Все эти движения важны для приведения в контакт взаимодействующих молекул.

Скорости движения молекул могут быть измерены с помощью многих пектроскопических методов, которые показывают, например, что большой глобулярный белок постоянно находится в движении, вращаясь вокруг оси примерно миллион раз в секунду. Скорости диффузионных столкновений, обусловленных трансляционными движениями, пропорциональны концентрации диффузионных молекул. На-

пример, если типичная внутриклеточная концентрация -1 мМ, то каждый участок белковой молекулы будет испытывать около 10^6 случайных столкновений в секунду с молекулами АТР; если концентрация на порядок ниже, число столкновений упадет до 10^5 в секунду и т.д.

Если две молекулы столкнулись и находятся в правильной взаимной ориентации, химическая реакция между ними может произойти очень быстро. Узнав о том, как быстро движутся и реагируют молекулы, мы не должны удивляться наблюдаемой скорости ферментативного катализа.

3.1.6. Процесс молекулярного узнавания не может быть совершенно безошибочным [7]

Все молекулы обладают энергией: кинетической энергией трансляционных движений, вибраций и вращений и потенциальной энергией, запасенной в электронных оболочках. Благодаря молекулярным столкновениям эта энергия случайным образом распределяется по разным атомам, так что, хотя уровень энергии большинства атомов близок к среднему, небольшая часть атомов будет обладать значительной энергией. Благоприятные конформации, или состояния молекул, соответствуют минимуму свободной энергии (см. разд. 2.4.1), но при сильных столкновениях возникают высокие состояния энергии. Зная температуру, можно рассчитать вероятность того, что атом или молекула окажутся в этом энергетическом состоянии (см. табл. 3-3). Вероятность высокого энергетического состояния становится меньше вероятности низкого энергетического состояния по мере того, как увеличивается разность их свободных энергий. Она, однако, обращается в нуль лишь тогда, когда эта разность значений энергий становится бесконечной.

Из-за элемента случайности при молекулярных взаимодействиях время от времени происходит небольшое число «побочных реакций». Поэтому клетка часто ошибается. Иногда происходят даже энергетически невыгодные реакции. Например, два атома, связанные ковалентно, при особо сильном столкновении могут разъединиться. Аналогичным образом специфичность фермента в отношении субстрата не может быть абсолютной, так как способность отличить одну молекулу от другой не может быть совершенной. Ошибки могли бы быть полностью устранены лишь в том случае, если бы в клетке развились механизмы с бесконечно большой разницей энергий альтернативных состояний. Поскольку это невозможно, клетки вынуждены мириться с определенным уровнем ошибок и использовать различные репарирующие реакции, чтобы исправлять те из них, которые являются наиболее опасными.

С другой стороны, как мы уже знаем, ошибки играют важную роль в живом мире. Если бы не случайные ошибки при синтезе ДНК, вряд ли эволюция была возможной (см. разд. 3.2.4).

Заключение

В последовательности субъединиц макромолекул заключена информация, і определяющая пространственную конфигурацию их поверхности. Именно она используется для узнавания друг друга разными молекулами и разными частями одной и той же молекулы посредством слабых нековалентных связей. Молекулы находятся в постоянном быстром движении; если при соударении в результате случайной диффузии, происходит узнавание, они связываются между собой с силой, которую можно выразить с помощью константы равновесия. Поскольку узнавание может быть безошибочным лишь при увеличении энергии взаимодействия до бесконечно

большой величины, живые клетки постоянно допускают ошибки. При необходимости ошибки исправляются с помощью специальных механизмов репарации.

3.2. Нуклеиновые кислоты [8]

3.2.1. Гены состоят из ДНК [9]

Еще в те времена, когда человек начал сеять культурные растения и разводить домашних животных, было очевидно, что каждое зернышко или оплодотворенная яйцеклетка должны содержать скрытый план или схему развития организма. Уже в наше время возникла генетика - наука, в основу которой легли представления о генах - невидимых, содержащих информацию элементах, равномерно распределяемых между двумя дочерними клетками при каждом клеточном делении. Чтобы передать дочерним клеткам полный набор генов, перед делением клетка должна сделать копию этих генов. Гены спермия и яйцеклетки передают наследственную информацию от поколения к поколению.

В наследовании биологических признаков используются совокупности атомов, подчиняющихся физическим и химическим законам. Другими словами, гены должны состоять из молекул. Вначале трудно было представить себе природу этих молекул. Что это за молекула, которая могла бы храниться в клетке, направлять процесс развития организма и быть в то же время способной к точной и практически неограниченной репликации?

К концу XIX столетия биологи обнаружили, что *хромосомы* (которые становятся различимыми в ядре в начале деления) являются носителями наследственной информации. Но данные о том, что веществом, из которого состоят гены, является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) хромосом, были получены значительно позже при изучении бактерий. В 1944 г. было установлено, что очищенная ДНК одного бактериального штамма способна передавать наследственные свойства этого штамма другому штамму, несколько отличному от первого. Это открытие оказалось слишком неожиданным и не получило широкого признания до начала 50-х годов, так как считалось, что лишь белки обладают достаточно сложной конформацией, чтобы быть носителями заключенной в генах информации. Сегодня представление о том, что именно ДНК является носителем генетической информации (хранящейся в ее длинных полинуклеотидных цепях), столь прочно вошло в биологическое мышление, что порой трудно осознать, какой огромный пробел в наших знаниях заполнило это представление.

3.2.2. Молекулы ДНК состоят из двух длинных комплементарных цепей, удерживаемых вместе благодаря спариванию оснований [10]

Учитывая простое химическое строение ДНК, легко понять, почему генетики с таким трудом признали в ней носителя наследственности. ДНК - это длинный неразветвленный полимер, состоящий всего из четырех субъединиц-дезоксирибонуклеотидов, азотистые основания которых представлены аденином (A), цитозином (C), гуанином (G) и тимином (T). Нуклеотиды связаны между собой ковалентными фосфодиэфирными связями, соединяющими 5'-атом углерода одного остатка с 3'-атомом углерода следующего остатка (схема 2-6). Основания четырех типов «нанизаны» на сахарфосфатную цепь наподобие четырех разных типов бусинок, надетых на одну нитку.

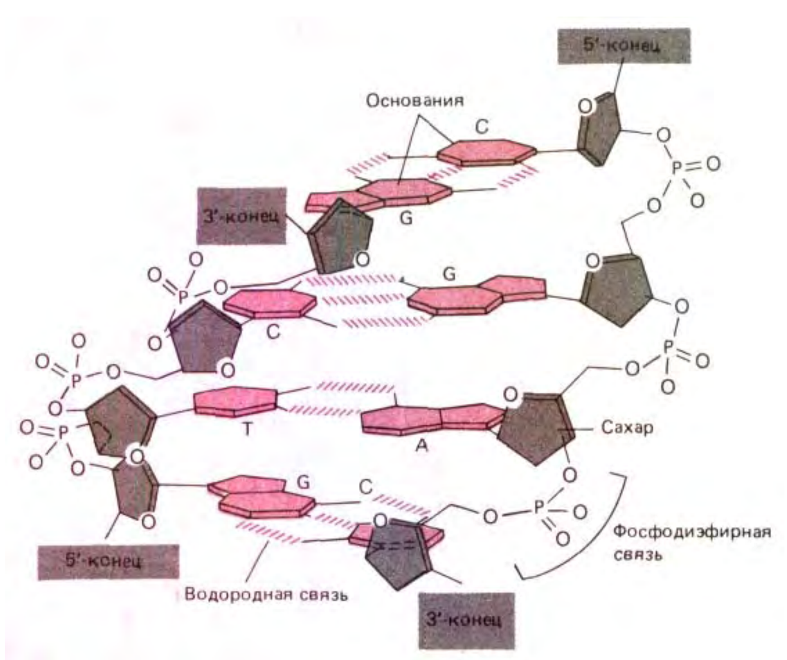


Рис. 3-8. Короткий участок двойной спирали ДНК. Показаны четыре пары комплементарных оснований *(цветные)* и дезоксирибоза *(серая)*. Следует обратить внимание, что две цепи ДНК закручены в противоположных направлениях и что каждая пара оснований удерживается вместе либо двумя, либо тремя водородными связями (см. также схему 3-2).

Как же может длинная полинуклеотидная цепь кодировать программу развития целого организма или даже одной клетки? И как эта программа передается от одного поколения клеток к другому? Ответ заключен в пространственной структуре молекулы ДНК.

Полученные в начале 50-х годов данные рентгеноструктурного анализа ДНК указывали на то, что молекула ДНК имеет форму спирали, состоящей из двух цепей. Спиральное строение ДНК не вызвало удивления, поскольку, как мы уже убедились, спирализация - частое явление для полимеров, состоящих из регулярно ориентированных субъединиц. Всех поразил тот факт, что ДНК состоит из двух цепей. В 1953 г. была предложена модель структуры ДНК, удовлетворяющая рентгеноструктурным данным и связывающая воедино структуру и функцию ДНК (рис. 3-8 и схема 3-2).

Согласно этой модели, разработанной Уотсоном и Криком, все основания ДНК расположены *внутри* двойной спирали, а сахарофосфатный остов - снаружи. Отсюда следует, что основания одной цепи должны быть очень сильно сближены с основаниями другой цепи. Это предположение требовало наличия специфического *связывания* между большим пуриновым основанием (А или G, каждое из которых имеет двойной гетероцикл) одной цепи и меньшим по размеру пиримидиновым основанием (Т или С с одинарным гетероциклом) другой цепи.

И данные ранних биохимических опытов, и выводы из построенной модели приводили к заключению, что между А и Т и между G и С (так называемые пары оснований Уотсона и Крика) происходит **комплементарное спаривание.** Биохимические анализы препаратов ДНК, выделенных из разных видов, показали, что, хотя нуклеотидный состав ДНК широко варьирует (например, содержание А у разных видов бактерий колеблется от 13 до 36%), наблюдается общая закономерность: количество G всегда равно количеству С и количество А-количеству Т. Построенная модель показала, что число эффективных водородных связей, которые могут образоваться между G и С или между А и Т будет в этом случае больше, чем при любой другой комбинации. Таким образом, двухспиральная модель ДНК изящно объяснила количественные биохимические результаты.

3.2.3. Структура ДНК дает ключ к пониманию механизмов наследственности [11]

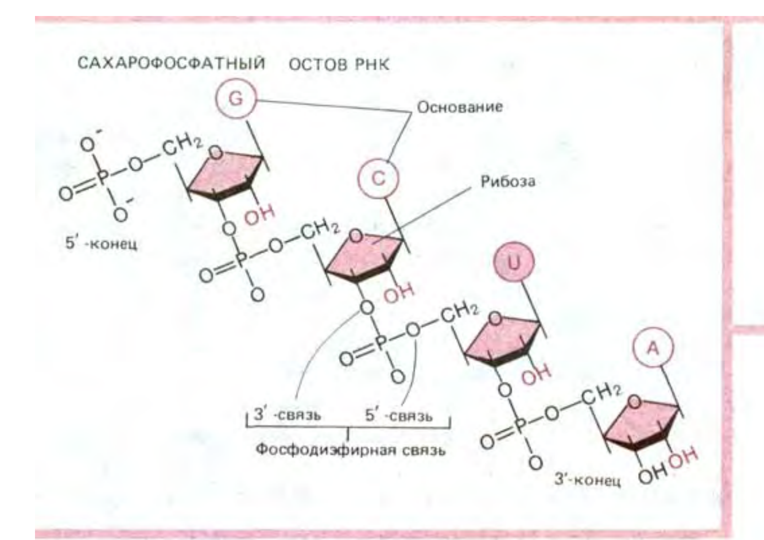
Биологическая информация записана в гене в такой форме, что она может точно копироваться и передаваться клеткам-потомкам. Огромное значение расшифровки структуры ДНК состоит в том, что предложенная Уотсоном и Криком модель позволила сформулировать общие принципы важнейшего процесса передачи генетической информации. Поскольку каждая цепь содержит последовательность нуклеотидов, в точности комплементарную последовательности цепи-партнера, то на деле обе цепи несут одну и ту же генетическую информацию. Если обозначить две цепи А и А', то цепь А служит шаблоном, или *матрицей,* для образования новой цепи А', а цепь А' может играть ту же роль в образовании новой цепи А. Таким образом, генетическая информация может копироваться при разделении цепей А и А', что позволяет каждой из них служить матрицей для образования нового комплементарного партнера.

Уже сам по себе механизм комплементарного копирования указывает, что наследственная информация ДНК записана в линейной последовательности нуклеотидов. Каждый нуклеотид - A, G, T или C - можно рассматривать как букву в простом четырехбуквенном алфавите, который используется для написания биологических инструкций в виде линейной «телеграфной ленты». Животные разных видов отличаются друг от друга, потому что молекулы ДНК их клеток имеют различную последовательность нуклеотидов и, следовательно, различное информационное содержание.

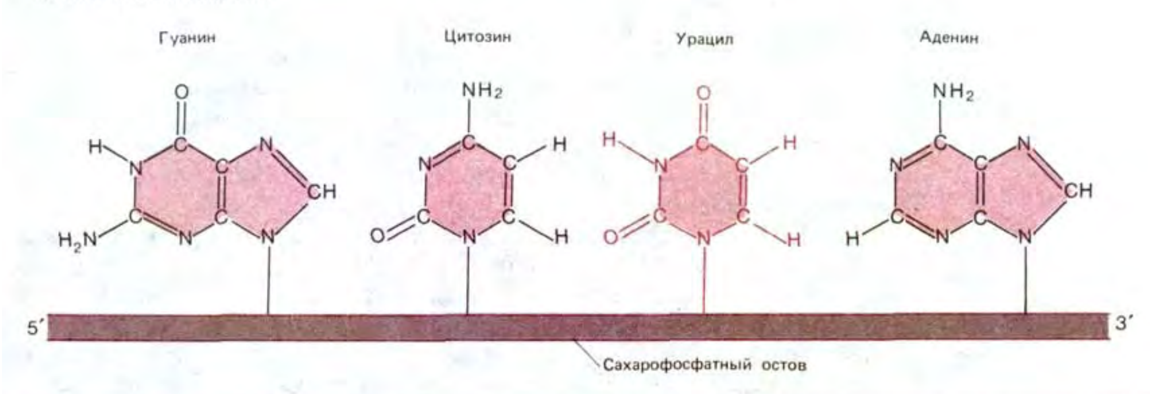
Число различных последовательностей ДНК, которые могут быть составлены из *n* нуклеотидов, равно 4^n. Поэтому ДНК даже умеренной длины способна обеспечить колоссальное биологическое разнообразие, а типичная клетка животного содержит ДНК длиной около метра ($3 \cdot 10^9$ нуклеотидов). Записанный в виде линейной последовательности один необычно маленький ген человека занял бы четверть страницы текста (рис. 3-9), а записанная в таком виде генетическая информация клетки человека представляла собой книгу в 500000 страниц!

Хотя принцип репликации генов прост и элегантен, реальный клеточный аппарат копирования сложен и включает в себя много различных белков. Основная реакция показана на рис. 3-10. Фермент ДНК-полимераза катализирует присоединение дезоксирибонуклеотида к 3'-концу цепи ДНК. Каждый нуклеотид вступает в реакцию в форме **дезоксирибонуклеозидтрифосфата;** высвобождение из этой активированной формы пирофосфата и его последующий гидролиз обеспечивают энергией реакцию **репликации ДНК** и делают ее фактически необратимой (см. разд. 5.3).

Репликация ДНК начинается с локального разделения двух комплементарных цепей. Затем каждая цепь используется в качестве матрицы для образования новой молекулы ДНК путем последовательного присоединения дезоксирибонуклеотидов. Выбор каждого следующего нуклеотида происходит на основе его способности образовывать комплементарную пару с очередным нуклеотидом родительской матричной цепи (рис. 3-10). В результате генетическая информация полностью удваивается - в конце концов образуются две полные двойные спирали ДНК, каждая из которых идентична родительской молекуле ДНК по последовательности нуклеотидов. Поскольку две цепи родительской молекулы в конце концов оказываются в разных дочерних молекулах ДНК, механизм репликации называют *«полуконсервативным»* (рис. 3-11).

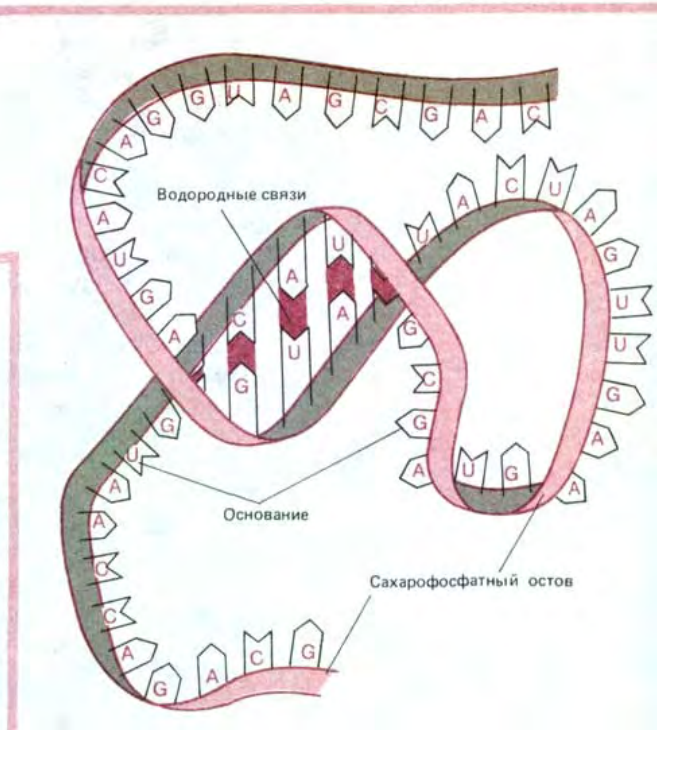


РНК и ДНК — это линейные полимеры, состоящие из нуклеотидов. РНК отличается от ДНК тем, что 1) ее сахарофосфатный остов содержит рибозу, а не дезоксирибозу, 2) вместо тимина в ее состав входит урацил, 3) молекулы РНК — одноцепочечные



ОДИНОЧНАЯ ЦЕПЬ РНК

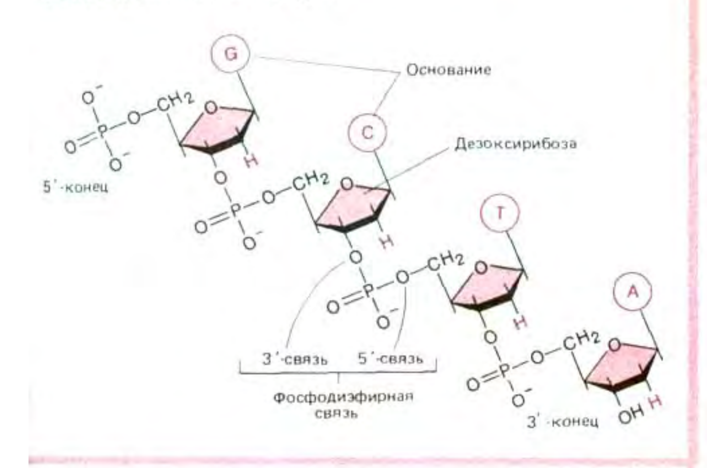
Молекулы РНК — одноцепочечные, но содержат короткие спаренные области, образованные разными участками одной молекулы, случайно оказавшимися комплементарными



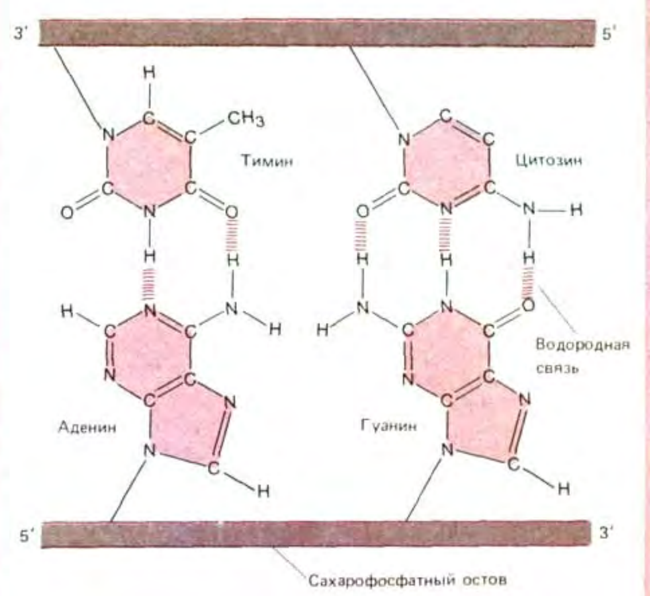
ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОФОТОГРАФИЯ РНК



САХАРОФОСФАТНЫЙ ОСТОВ ДНК



ЧЕТЫРЕ ОСНОВАНИЯ ДНК, ОБРАЗОВАВШИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ПАРЫ



Специфически связанные водородными связями G и C, а также A и T (в РНК A и U) образуют пары комплементарных оснований

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОФОТОГРАФИЯ ДНК



ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ ДНК

Молекулы ДНК состоят из двух антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи завиты одна вокруг другой в правую спираль так, что на один виток спирали приходится приблизительно 10 пар оснований.

Сахарофосфатный остов

Основание

Водородная связь

1 виток спирали = 3,4 нм

Малая бороздка

Большая бороздка

```
CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAG
CTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTTCATAACAATTGTTTTC
TTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
TGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAA
AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTT
TTATTTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCT
TTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTC
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCT
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATT
CACCCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATA
TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA
TGATGTATTTAAATTATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCA
TTTAAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTTC
AAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGCACATTGGCAACAGCCCCTGATGC
CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGTATTTTACATTACTTAT
TGTTTTAGCTGTCCTCATGAATGTCTTTTC
```

Рис. 3-9. Последовательность ДНК гена β -глобулина человека (одной из двух субъединиц молекулы гемоглобина, переносящего кислород в крови взрослого человека). Показана только одна из двух цепей ДНК («кодирующая цепь»), вторая цепь имеет комплементарную последовательность. Последовательность следует читать слева направо, строка за строкой, как обычный текст.

3.2.4. Ошибки репликации ДНК приводят к мутациям [12]

Наиболее впечатляющая особенность репликации ДНК - ее высокая точность. Для устранения неправильно расположенных нуклеотидов используется несколько «корректорских» механизмов, в результате их работы последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК копируется очень точно (одна ошибка на 10^9 присоединенных нуклеотидов).

Но иногда, хотя и очень редко, репликативная машина пропускает несколько оснований или вставляет несколько лишних, включает Т вместо С или А вместо G. Каждое такое изменение последовательности ДНК - генетическая ошибка, называемая **мутацией.** Такие ошибки будут

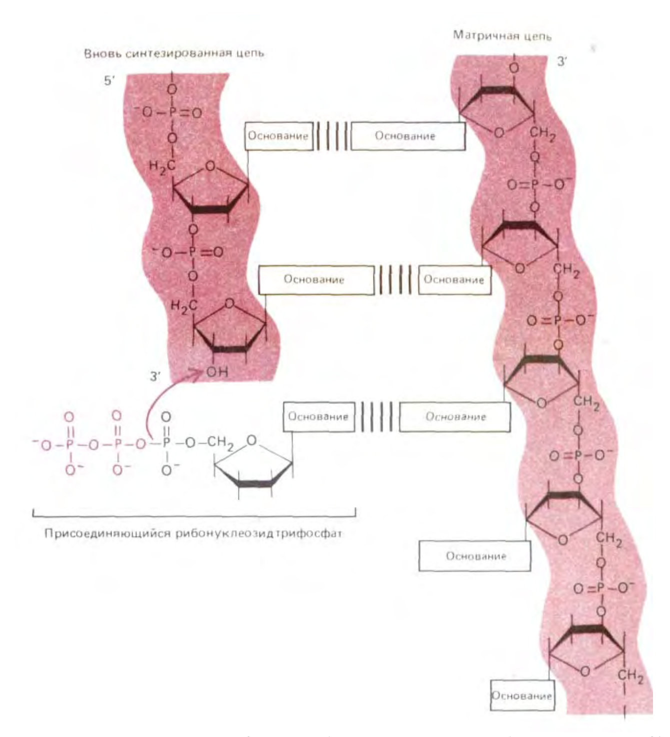


Рис. 3-10. Основная реакция при синтезе новых молекул ДНК -это добавление дезоксирибонуклеотида к 3'-концу растущей цепи. Показано, как спаривание оснований поступающих дезоксирибонуклеотидов и исходной (матричной) цепи ДНК направляет образование дочерней цепи ДНК с комплементарной последовательностью оснований.

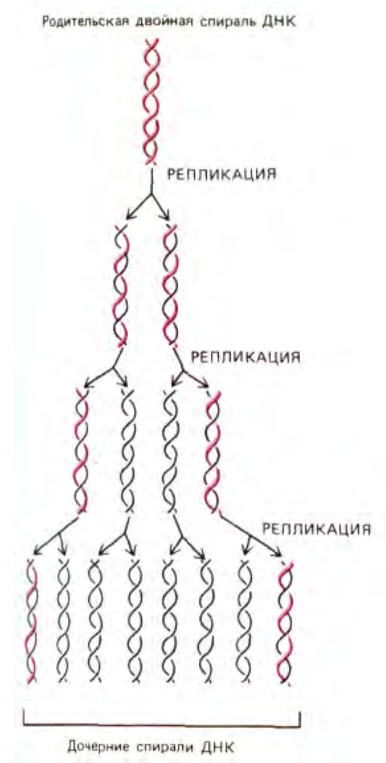


Рис. 3-11. Полуконсервативная репликация ДНК. В каждом цикле репликации каждая из двух цепей ДНК используется в качестве матрицы для образования новой комплементарной цепи. Поэтому на протяжении многих клеточных поколений исходные цепи сохраняют свою целостность.

воспроизводиться во всех последующих поколениях клеток, так как «плохие» последовательности ДНК копируются столь же успешно, как и «хорошие». Последствия такой ошибки могут быть существенными, поскольку даже один измененный нуклеотид способен оказать большое влияние на работу клетки, в зависимости от того, где эта мутация произошла.

В начале 40-х годов генетики окончательно доказали, что единицы последовательности, называемые генами, определяют структуру индивидуальных белков. Поэтому мутация гена, вызванная изменением последовательности его ДНК, может инактивировать ключевой белок, и клетка тогда погибнет. В результате измененная последовательность ДНК потеряется. Мутация может произойти в несущественном участке и не будет иметь эффекта; такие мутации называют *молчащими*. Очень редко в результате мутации образуется ген с улучшенными или новыми полезными функциями. В этих случаях несущий мутацию организм будет иметь преимущества и мутантный ген может в конце концов путем естественного отбора заменить исходный ген в большей части популяции.

3.2.5. Последовательность нуклеотидов в гене определяет последовательность аминокислот в белке [13]

Химически ДНК относительно инертна. Содержащаяся в ней информация выражается опосредованно через другие молекулы: ДНК направляет синтез специфических РНК и белковых молекул, которые и определяют химические и физические свойства клеток.

Примерно в то же время, когда биофизики с помощью дифракции рентгеновских лучей исследовали пространственную структуру ДНК, биохимики интенсивно изучали химическое строение белков. Уже было известно, что белки - это цепи аминокислот, последовательно соединенных пептидными связями; но лишь в начале 50-х годов, когда была определена последовательность аминокислот маленького белка *инсулина* (рис. 3-12), было установлено, что каждый тип белка образует полипептидная цепь со строго определенной последовательностью аминокислот.

Подобно тому как для выяснения молекулярных основ генетики и наследственности решающую роль сыграла расшифровка структуры ДНК, определение последовательности инсулина имело основополагающее значение для выяснения структуры и функций белков. Если инсулин имеет определенную генетически детерминированную последовательность, то, видимо, то же относится и ко всем другим белкам. Более того, можно предположить, что свойства того или иного белка должны зависеть от той конкретной последовательности, в которой расположены в этом белке аминокислоты.

И ДНК, и белки образованы линейной последовательностью мономеров. В результате биохимического анализа белков - продуктов мутантных генов - в конце концов было показано, что последовательность двух этих полимеров колинеарна: последовательность нуклеотидов

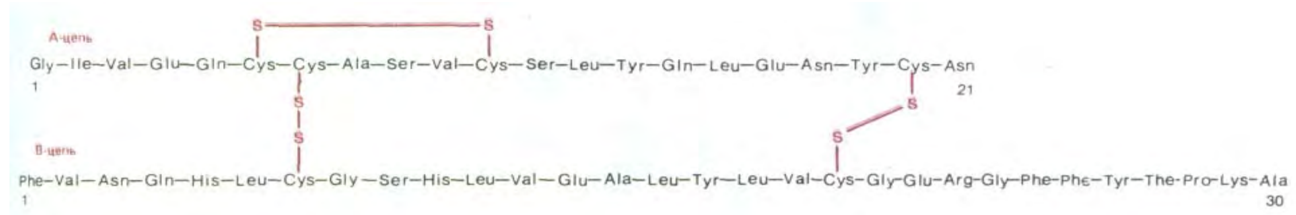


Рис. 3-12. Последовательность аминокислот инсулина крупного рогатого скота. Инсулин - маленький белок, состоящий из двух полипептидных цепей, каждая из которых обладает уникальной, генетически детерминированной последовательностью аминокислот. Для обозначения аминокислот использованы трехбуквенные символы, приведенные на схеме 2-5. Показаны дисульфидные (-S-S-) связи между остатками цистеина. Изначально белок синтезируется как одна длинная полипептидная цепь (кодируемая одним геном), которая затем разделяется, давая две цепи (см. рис. 3-48).

в участке ДНК, кодирующем белок, соответствует последовательности аминокислот в этом белке. Стало очевидным, что последовательность ДНК содержит закодированную информацию о белковых последовательностях. Центральной проблемой молекулярной биологии стал вопрос о том, как же клетка осуществляет такое биохимически сложное превращение, как перевод последовательности нуклеотидов ДНК в последовательность аминокислот белка.

3.2.6. С последовательностей ДНК снимаются РНК-копии для синтеза белка [14]

При синтезе белка определенные участки ДНК, называемые *генами,* копируются в виде другого полинуклеотида - рибонуклеиновой кислоты, или РНК, - отличающегося от ДНК как по химическому составу, так и по выполняемой функции. Подобно ДНК, РНК образована линейной последовательностью нуклеотидов, но имеет два небольших химических отличия: 1) вместо дезоксирибозы сахарофосфатный остов содержит сахар рибозу и 2) вместо основания тимина (Т) в РНК содержится близкородственное основание урацил (U) (см. рис. 3-6).

РНК сохраняет все информационное содержание той ДНК, копией которой она является, а также способность к спариванию комплементарных оснований. Синтез молекул РНК называется **транскрипцией ДНК;** во многих отношениях он аналогичен репликации ДНК. Одна из цепей ДНК служит матрицей, на которой испытывается способность очередных нуклеотидов к комплементарному спариванию. При хорошем соответствии с ДНК-матрицей рибонуклеотид включается в растущую цепь РНК как ковалентно связанная составная часть. Таким способом цепь РНК удлиняется последовательным добавлением одного нуклеотида.

Транскрипция отличается от репликации ДНК рядом особенностей. Во-первых, РНК-продукт не остается комплементарно связанным с ДНК-матрицей. Как только синтез копии РНК завершен, исходная двойная спираль ДНК восстанавливается, а молекула РНК освобождается. Таким образом, молекулы РНК одноцепочечные. Более того, молекулы РНК короче ДНК, так как являются копиями участков ДНК ограниченной длины, достаточной для кодирования одного или нескольких белков (рис. 3-13). РНК-транскрипты, направляющие синтез

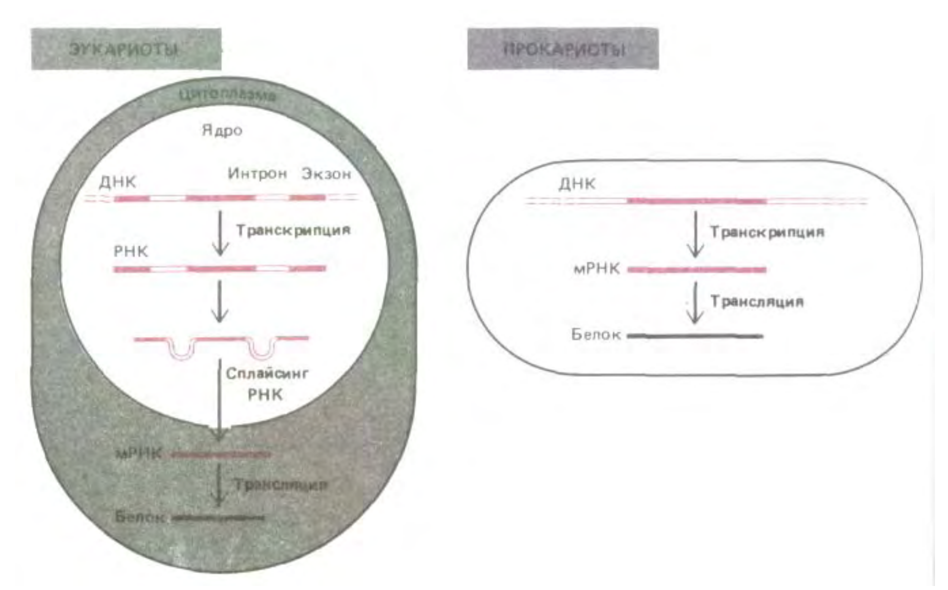


Рис. 3-13. Передача информации от ДНК к белку осуществляется с помощью РНК-посредника, называемого мРНК. У прокариотических клеток этот процесс проще, чем у эукариотических. У эукариот кодирующие участки ДНК-экзоны (выделены цветом) разделены некодирующими участками (интронами). Показано, что для образования мРНК интроны должны удаляться.

белковых молекул, называются **информационными (матричными) РНК (мРНК);** другие РНК-транскрипты используются как **транспортные РНК (тРНК)** (см. разд. 3.2.10), образуют компоненты рибосом **(рибосомные, рРНК,** см. разд. 3.2.10) или более мелкие нуклеопротеиновые частицы. Количество молекул РНК, копируемых с определенного участка ДНК, контролируется **регуляторними белками,** которые связываются со специфическими участками ДНК, закрывая кодирующие последовательности гена (см. разд. 10.2.1). В любой клетке в любой момент времени некоторые гены используются для синтеза РНК в очень больших количествах, тогда как другие гены не транскрибируются совсем. Для некоторых активных генов в каждом клеточном поколении один и тот же участок ДНК может транскрибироваться тысячи раз. Поскольку каждая молекула РНК может транслироваться во многие тысячи копий, то информация, содержащаяся в маленьком участке ДНК, может направлять синтез миллионов копий специфического белка. Например, белок **фиброин** - основной компонент шелка: один ген фиброина в каждой клетке шелкоотделительной железы производит 10^4 копий мРНК, на каждой из которых синтезируется 10^5 молекул фиброина, что за 4 сут дает 10^9 молекул фиброина на клетку.

3.2.7. Молекулы РНК эукариотических клеток подвергаются сплайсингу, чтобы убрать интронные последовательности [15]

В бактериальных клетках большинство белков кодируется одной непрерывной последовательностью ДНК, которая копируется без изменения с образованием молекулы мРНК. В 1977 г. молекулярные биологи были изумлены, обнаружив, что у большинства эукариотических генов кодирующие последовательности (названные *экзонами),* чередуются с некодирующими последовательностями (названными *нитронами).* Для производства белка весь ген, включая и интроны, и экзоны, транскрибируется в очень длинную молекулу РНК *(первичный транскрипт).* Перед тем как эта молекула РНК покинет ядро, комплекс ферментов, осуществляющих процессинг РНК, удаляет у нее все последовательности интронов, делая молекулу РНК значительно короче. После завершения этой стадии процессинга РНК, которая носит название **сплайсинга РНК,** молекула РНК выходит в цитоплазму уже как мРНК и направляет синтез определенного белка (см. рис. 3-13).

Этот кажущийся расточительным способ передачи информации развился у эукариот, видимо, потому, что он делает синтез белка значительно более гибким. Например, первичные транскрипты РНК одного и того же гена могут подвергаться сплайсингу разными способами, давая разные мРНК в зависимости от клеточного типа или стадии развития. Это позволяет производить разные белки под контролем одного и того же гена. Более того, поскольку присутствие многочисленных нитронов облегчает генетическую рекомбинацию между экзонами, такой способ устройства гена, видимо, имел огромное значение в ранней эволюционной истории, ускоряя процесс, посредством которого организмы синтезировали новые белки из частей ранее существовавших, вместо того, чтобы вырабатывать целиком новые последовательности.

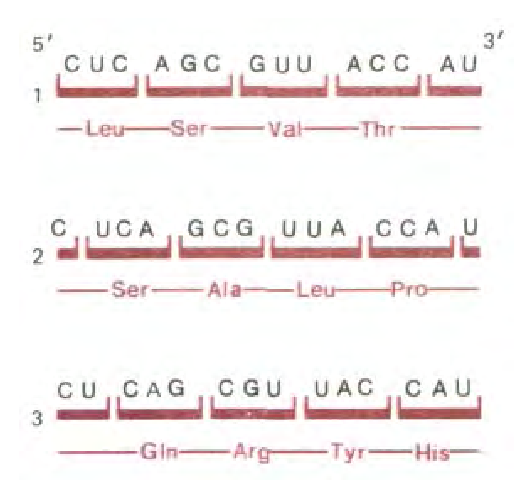


Рис. 3-14. Три рамки считывания, возможные при синтезе белка. Последовательность нуклеотидов РНК считывается по порядку от 5'- к 3'-концу по три нуклеотида и таким образом переводится в последовательность аминокислот. Поэтому одна и та же последовательность РНК может в принципе в зависимости от «рамки считывания» кодировать три совершенно различные последовательности аминокислот.

3.2.8. Последовательность мРНК «считывается» группами по три нуклеотида и переводится в последовательность аминокислот [16]

Правила перевода последовательности полинуклеотидов в аминокислотную последовательность белков - так называемый **генетический код -** были расшифрованы в начале 60-х годов. Оказалось, что последовательность нуклеотидов молекулы мРНК - посредника при передаче информации от ДНК к белку - считывается по порядку группами из трех нуклеотидов. Каждый триплет нуклеотидов, или **кодон,** определяет включение одной аминокислоты, и в принципе каждая молекула мРНК может быть прочитана в любой из трех *рамок считывания* в зависимости от того, с какого именно нуклеотида молекулы начался процесс декодирования (рис. 3-14). Почти всегда лишь одна из трех рамок считывания дает функциональный белок. Так как, за исключением начала и конца кодирующего участка, информация записана в РНК без знаков препинания, рамка считывания устанавливается при инициации трансляции и сохраняется на протяжении всего процесса.

Поскольку РНК является линейным полимером, состоящим из нуклеотидов четырех типов, то всего имеется $4^3 = 64$ возможных триплета (напомним, что важное значение имеет последовательность нуклеотидов триплета). Учитывая, что в белках находят всего 20 различных аминокислот, можно сделать вывод, что большинство аминокислот должно кодироваться несколькими триплетами; другими словами генетический код *вырожден.* Генетический код, представленный на рис. 3-15, оказался чрезвычайно консервативным в эволюции: за небольшими исключениями он остается одинаковым у таких разных организмов, как бактерии, растения и человек.

3.2.9. Соответствие между аминокислотами и триплетами нуклеотидов устанавливают молекулы тРНК [17]

Кодоны мРНК узнают соответствующие аминокислоты не прямым путем - не так, как фермент узнает субстрат. При **трансляции** использу-

Первое положение (5′-конец)	Второе положение U	C	A	G	Третье положение (3′-конец)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Стоп	Стоп	A
	Leu	Ser	Стоп	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Рис. 3-15. Генетический код. При синтезе белка триплеты нуклеотидов РНК (кодоны) транслируются в соответствующие им аминокислоты. Например, кодоны GUG и GAG направляют в белок соответственно валин и глутаминовую кислоту. Обратите внимание, что кодоны с U или C во втором положении обычно кодируют более гидрофобные аминокислоты (схема 2-5).

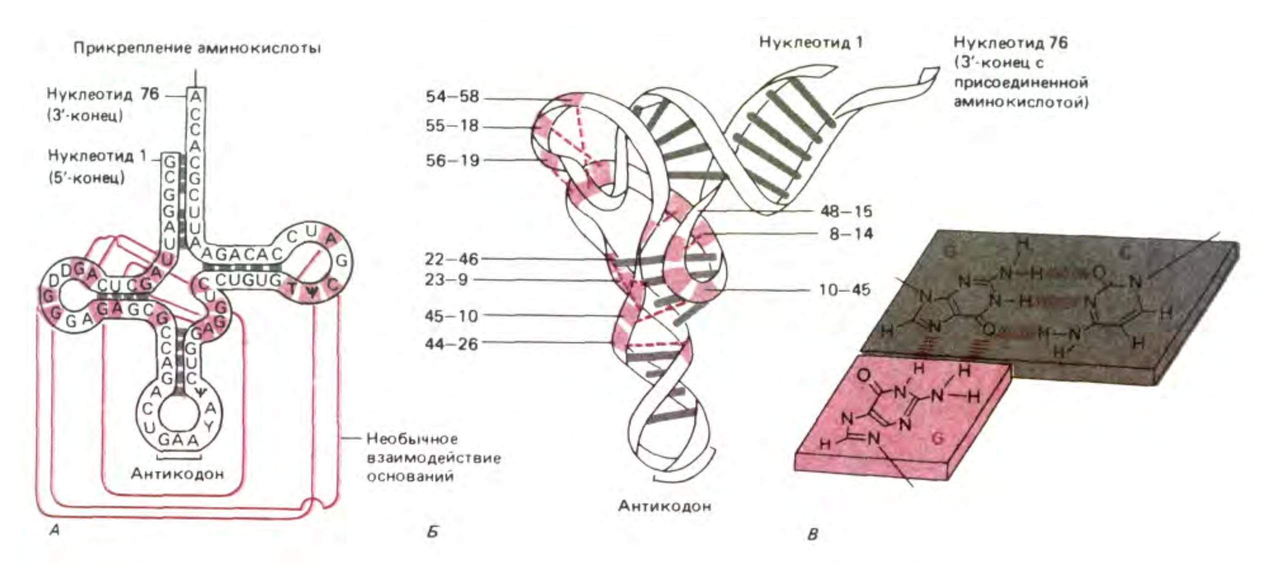


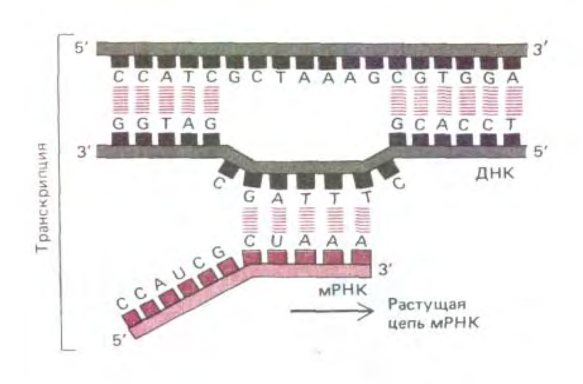
Рис. 3-16. Фенилаланиновая тРНК дрожжей. *А.* Молекула изображена в форме «кленового листа», чтобы показать комплементарное спаривание (выделено серым) внутри спиральных участков молекулы. *Б.* Схематическое изображение реальной формы молекулы, основанное на данных рентгеноструктурного анализа. Комплементарное спаривание обозначено серыми линиями. Нуклеотиды, участвующие в некомплементарном спаривании оснований, удерживающем вместе сегменты цепи, выделены цветом, а соответствующие пары оснований пронумерованы и связаны цветными пунктирными линиями, которые соответствуют цветным линиям в *А. В.* Необычное взаимодействие между парами оснований. Одно основание образует водородные связи с двумя другими; несколько таких «троек оснований» помогают свертывать эту молекулу тРНК.

ются «адапторы» - молекулы, узнающие и аминокислоту, и триплет нуклеотидных оснований. Роль адапторов выполняет набор маленьких (длиной всего около 80 нуклеотидов каждая) молекул РНК, называемых *транспортными РНК* (или *тРНК).*

Каждая молекула тРНК имеет характерную пространственную структуру, поддерживаемую теми же нековалентными взаимодействиями, которые удерживают вместе две цепи в двойной спирали ДНК. Однако в одноцепочечной молекуле тРНК комплементарное спаривание между нуклеотидными основаниями происходит в пределах одной цепи. Это приводит к тому, что молекула тРНК принимает определенную конформацию, существенную для выполнения функций адаптора. Четыре коротких сегмента молекулы образуют двухспиральную структуру, придающую молекуле вид двумерного «кленового листа». Этот кленовый лист в свою очередь упаковывается в многоскладчатую L-образную фигуру, которая скрепляется более сложными взаимодействиями на основе водородных связей (рис. 3-16). Два набора неспаренных нуклеотидных остатков по обоим концам «L» играют особенно важную роль для функционирования молекулы тРНК в биосинтезе белка: один из них образует *антикодон,* способный спариваться с комплементарным триплетом молекулы мРНК (кодоном); другой, имеющий последовательность ССА на 3'-конце молекулы, ковалентно связывается со специфической аминокислотой (рис. 3-16, *А).*

3.2.10. Считывание мРНК от одного конца до другого осуществляют рибосомы [18]

Перенос информации от мРНК к белку основан на том же принципе спаривания комплементарных оснований, что и перенос генетической информации от ДНК к ДНК и от ДНК к РНК (рис. 3-17). Однако процесс правильного расположения молекул тРНК на мРНК сложен и осуществляется **рибосомами,** комплексами, образованными более чем 50 различными белками, связанными с несколькими молекулами РНК (рРНК), выполняющими структурную роль. Каждая рибосома работает как большая биохимическая машина, на которой молекулы тРНК выстроены так, чтобы считывать закодированные в мРНК генетические инструкции. Сначала рибосома связывается со специальным участком молекулы мРНК и таким образом определяет рамку считывания и ами-



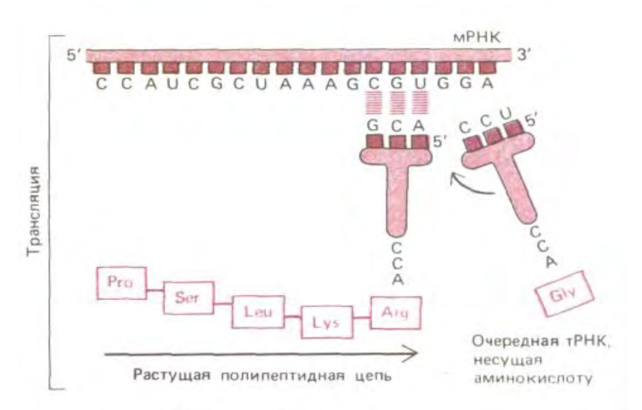


Рис. 3-17. Поток информации при синтезе белка. С участка в одной из цепей ДНК снимается комплементарная копия - матричная РНК. Затем нуклеотиды матричной РНК последовательно триплет за триплетом связывают комплементарные нуклеотиды антикодоновой петли определенных молекул тРНК. К противоположному концу каждой молекулы транспортной РНК (тРНК) прикреплена специфическая аминокислота и после спаривания эта аминокислота присоединяется к концу растущей белковой цепи. Таким образом, перевод последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот белка основан на комплементарном спаривании кодонов мРНК с антикодонами соответствующих молекул тРНК. Молекулярные основы переноса информации при трансляции оказываются аналогичными таковым при репликации и транскрипции ДНК. Заметим, что и синтез, и трансляция мРНК начинаются с 5'-конца.

ноконцевую аминокислоту белка. Затем рибосома по мере передвижения по молекуле мРНК транслирует кодон за кодовом, используя молекулы тРНК для последовательного присоединения аминокислот к растущему концу полипептидной цепи (рис. 3-18). Достигнув конца кодирующей части матрицы, рибосома и новосинтезированный карбоксильный конец белка отсоединяются от 3'-конца мРНК и переходят в цитоплазму клетки. Рибосомы работают очень эффективно: в 1 с одна бактериальная рибосома присоединяет к растущей полипептидной цепи 20 аминокислот. Подробнее структура рибосом и механизм синтеза белка описаны в гл. 5.

3.2.11. Некоторые молекулы РНК функционируют как катализаторы [19]

Когда-то молекулы РНК рассматривались как цепочка нуклеотидов с относительно неинтересными химическими свойствами. В 1981 г. эта точка зрения была поколеблена открытием каталитической молекулы РЫК с такими изощренными химическими свойствами, которые биохимики раньше связывали только с белками. Рибосомные молекулы РНК ресничного простейшего *Tetrahymena* вначале были синтезированы как большая группа предшественников. Было показано, что одна из рРНК получается путем реакции сплайсинга РНК. Удивительным в этом открытии было то, что сплайсинг можно осуществить in vitro в отсутствие белка. Позже было показано, что сама интронная последовательность обладает ферментоподобной активностью и может катализировать двухступенчатую реакцию, показанную на рис. 3-19.

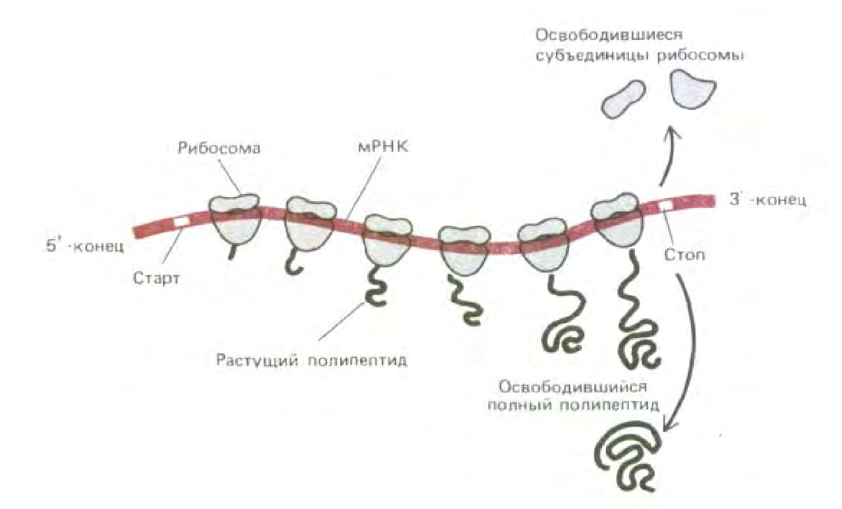


Рис. 3-18. Схема синтеза белка на рибосомах. Рибосомы присоединяются к стартовому сигналу вблизи 5'-конца молекулы мРНК и передвигаются к 3'-концу, синтезируя по пути белок. Часто по одной молекуле мРНК движутся одновременно несколько рибосом, синтезируя несколько идентичных полипептидных цепей; такая структура в целом называется *полирибосомой*.

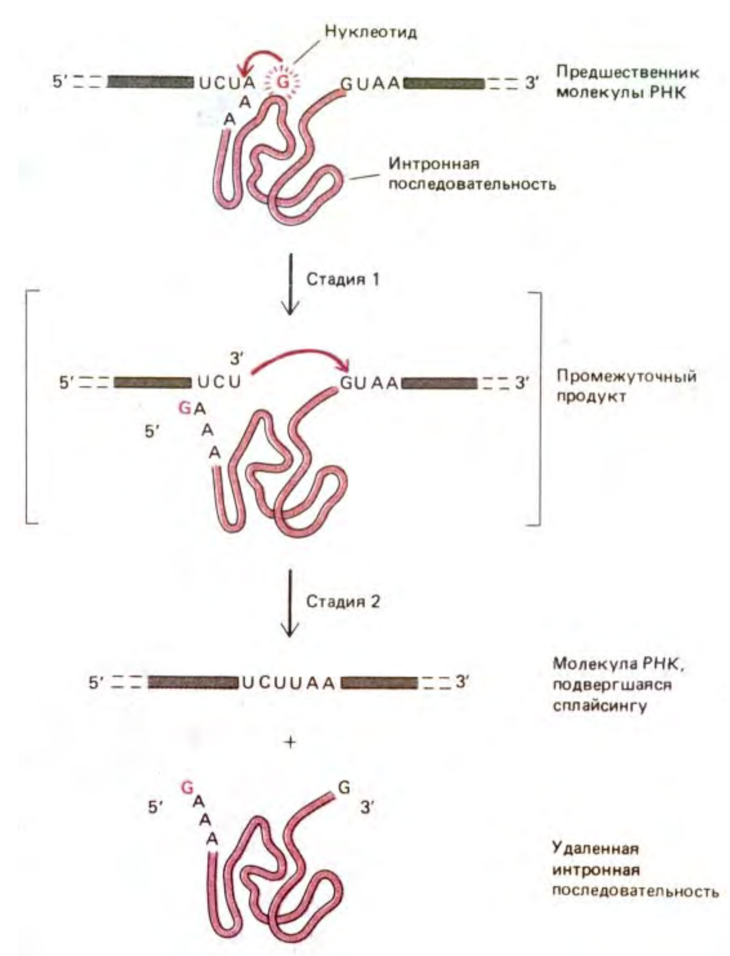


Рис. 3-19. Схема реакции самосплайсинга, при которой последовательность интрона катализирует собственное вырезание из молекулы рибосомной РНК у *Tetrahymena.* Реакция начинается с присоединения нуклеотида G к интронной последовательности, в результате чего происходит разделение цепи РНК. Затем вновь образованный 3'-конец цепи РНК подходит к другому концу и отделяет его, завершая реакцию.

В ходе дальнейших исследований было установлено, что синтезированная в пробирке интронная последовательность длиной в 400 нуклеотидов сворачивается с образованием структуры, способной функционировать как фермент в реакциях с другими молекулами РНК. Например, эта молекула способна связывать два специфических субстрата: нуклеотид гуанин и цепь РНК, и затем катализировать их ковалентное связывание, так что цепь РНК разрезается в специфической точке (рис. 3-20).

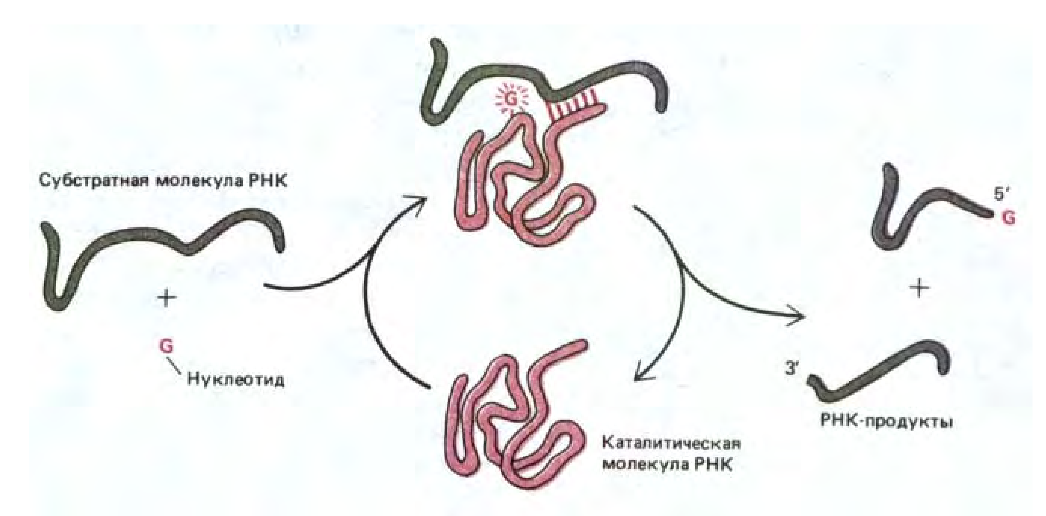


Рис. 3-20. Ферментоподобная реакция, катализируемая очищенной интронной последовательностью РНК у Tetrahymena. В этой реакции, которая соответствует первой стадии реакции, приведенной на рис. 3-19, и специфическая субстратная молекула РНК, и нуклеотид G тесно связываются с поверхностью каталитической молекулы РНК. Затем нуклеотид ковалентно связывается с субстратной молекулой РНК, разрезая ее в специфическом центре. Освобождение в результате этого двух цепей молекулы РНК дает возможность интронным последовательностям участвовать в дальнейших циклах реакции.

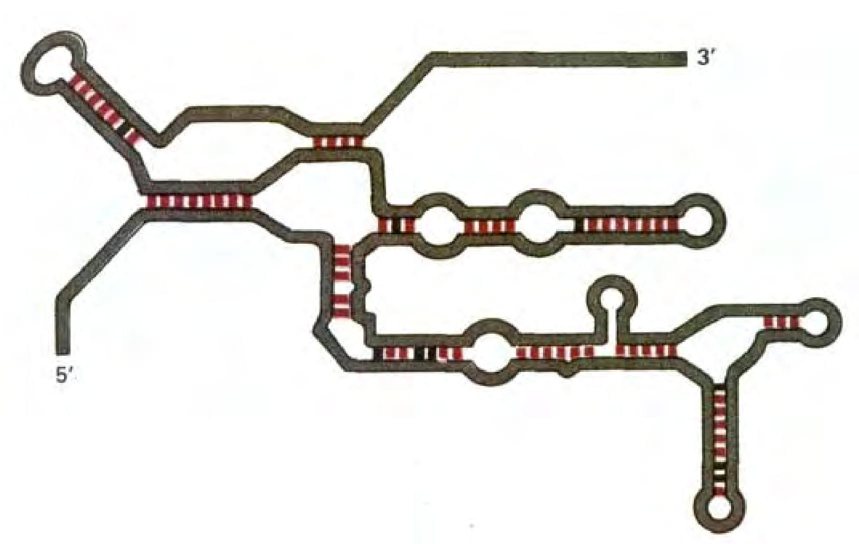


Рис. 3-21. Двумерное изображение каталитического остова интронной последовательности РНК, представленной на рис. 3-19 и рис. 3-20. Нормальные комплементарные пары оснований выделены цветом, а более слабые взаимодействия пар оснований показаны черным. Эта молекула содержит около 240 нуклеотидов; в нормальных условиях она свернута в плотную трехмерную структуру, но ее точная конформация неизвестна. РНК, способные к самосплайсингу и имеющие подобную структуру, были обнаружены в митохондриях грибов и в бактериальном вирусе (бактериофаг Т4).

В этой модельной реакции, которая соответствует первому шагу реакции на рис. 3-19, та же интронная последовательность действует многократно, разрезая многие цепи РНК. Хотя обычно сплайсинг РНК проходит без автокатализа, самосплайсинг РНК, установленный у *Tetrahymena,* был открыт и в других типах клеток, включая грибы и бактерии. Это позволяет предположить, что такие последовательности РНК могли возникнуть до расхождения родословных эукариот и прокариот около 1,5 млрд. лет назад.

В последнее время были открыты некоторые другие семейства каталитических РНК. Например, большинство тРНК изначально синтезировались как предшественники РНК, затем было показано, что одна молекула РНК играет основную каталитическую роль в РНК-белковом комплексе, распознавая эти предшественники и разрезая их в специфических точках. Катализирующая последовательность РНК играет также важную роль в жизненном цикле многих растительных вирусов, подобная последовательность обнаружена в РНК лягушки, хотя ее роль в данном случае не доказана. Более примечательно то, что обнаружение катализа на основе РНК дает теперь основания подозревать, что рибосомы обладают более широкими функциями, чем предполагалось. Весьма вероятно, что рибосомные белки играют второстепенную роль по сравнению с рибосомными РНК, которые составляют более половины массы рибосомы.

Каким образом молекулы РНК могут действовать наподобие ферментов? Пример тРНК показывает, что молекулы РНК могут складываться высокоспецифичным образом. Предложенная двумерная структура остова интронной последовательности *Tetrahymena,* способной к самосплайсингу, представлена на рис. 3-21. Взаимодействия между разными участками этой молекулы РНК (аналогичные необычным водородным связям в молекулах тРНК - см. рис. 3-16) ответственны за ее дальнейшее сворачивание с образованием сложной трехмерной поверхности с каталитическими свойствами. Необычное взаимное расположение атомов может деформировать ковалентные связи и, следовательно, придавать отдельным атомам в свернутой цепи РНК необычную реакционноспособность.

Как указывалось в гл. 1, открытие каталитических молекул РНК в корне изменило наши представления о происхождении первых живых клеток (см. разд. 1.3.4.).

Заключение

Генетическая информация записана в линейной последовательности нуклеотидов ДНК. Каждая молекула ДНК состоит из двух комплементарных полинуклеотидных цепей, удерживаемых вместе водородными связями, образующими GC- и AT-пары оснований. Репликация ДНК, обеспечивающая удвоение генетической информации, происходит путем образования новой комплементарной цепи на каждой из исходных цепей.

Экспрессия генетической информации, заключенной в ДНК, осуществляется путем трансляции линейной последовательности нуклеотидов в колинеарную последовательность аминокислот белка. Сначала ограниченный участок ДНК копируется на комплементарную цепь РНК. Этот первичный транскрипт РНК подвергается сплайсингу для удаления интронных последовательностей и превращается в молекулу мРНК. В конце концов мРНК транслируется с образованием белка путем сложного набора реакций, происходящих в рибосоме. Вначале аминокислоты, используемые для синтеза белка, прикрепляются к семейству молекул тРНК, каждая из которых путем комплементарного спаривания оснований узнает набор из трех нуклеотидов мРНК. Последовательность нуклеотидов мРНК считывается с одного конца к другому триплетами нуклеотидов в соответствии с универсальным генетическим кодом.

Другие молекулы РНК в клетках используются как ферментоподобные катализаторы. Эти молекулы РНК сворачиваются с образованием такой структуры, в которой некоторые нуклеотиды поверхности могут стать необычно активными.

3.3. Структура белка [20]

Клетки в значительной степени состоят из белков, на долю которых приходится более половины их сухого вещества (см. табл. 3-1). Белки определяют структуру и форму клетки; кроме того, они служат инструментами молекулярного узнавания и катализа. ДНК, хотя и содержит всю необходимую для построения клетки информацию, оказывает незначительное прямое воздействие на клеточные процессы. Например, ген гемоглобина сам не переносит кислород: это свойство белка, кодируемого им. Используя компьютерную терминологию, можно сказать, что ДНК и мРНК представляют собой «программное обеспечение» - инструкции, полученные клеткой от родительской клетки. Белки и молекулы каталитических РНК составляют «аппаратное обеспечение» - физические механизмы, осуществляющие хранящуюся в памяти программу.

ДНК и РНК представляют собой цепи, построенные из нуклеотидов, химически очень похожих друг на друга. Напротив, молекулы белков собраны из 20 очень разных аминокислот, каждая из которых обладает ярко выраженной химической индивидуальностью. Это разнообразие лежит в основе необычайной универсальности химических свойств различных белков, и, по-видимому, эволюция выбрала именно белки, а не молекулы РНК в качестве катализаторов большинства реакций в клетке.

3.3.1. Форма белковой молекулы определяется ее аминокислотной последовательностью [21]

В длинной полипептидной цепи возможно свободное вращение атомов вокруг многих связей, что делает остов белковой молекулы очень гибким. Поэтому любая белковая молекула в принципе может принимать почти бесконечно большое число различных форм *{конформаций)*. Однако большинство полипептидных цепей существуют лишь в одной из

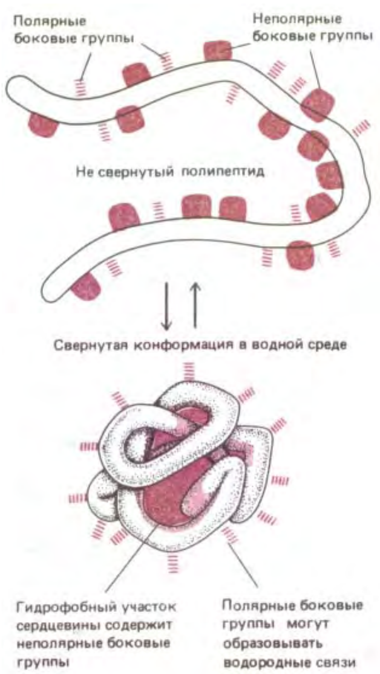


Рис. 3-22. Схематически показано, как белок свертывается в глобулу. Полярные боковые группы аминокислот стремятся расположиться на наружной поверхности белка, где они могут взаимодействовать с водой. Неполярные боковые группы аминокислот расположены внутри, где образуют «спрятанное» от воды гидрофобное «ядро».

этих конформаций, определяемой последовательностью аминокислот. Это обусловлено тем, что боковые группы аминокислот взаимодействуют друг с другом и с водой с образованием слабых нековалентных связей (см. схему 3-1). В этом случае соответствующие боковые группы оказываются в ключевых местах цепи, между ними образуются сильные связи, что делает определенную конформацию очень стабильной.

Полипептидная цепь большинства белков самопроизвольно сворачивается с образованием правильной конформаций. При обработке определенными агентами белок можно развернуть, или *денатурировать;* при прекращении действия денатурирующего агента белок обычно самопроизвольно возвращается к исходной конформаций. Это указывает на то, что вся необходимая информация для определения формы белка содержится в самой последовательности аминокислот.

Одним из важнейших факторов, направляющих свертывание полипептидной цепи, является расположение полярных и неполярных боковых групп. Многочисленные гидрофобные боковые группы стремятся собраться внутри белковой молекулы, что позволяет им избежать контакта с водным окружением (точно так же сливаются механически диспергированные в воде капельки масла). В то же время все полярные группы стремятся, наоборот, расположиться на поверхности молекулы белка, где они могут взаимодействовать с водой и другими полярными группами (рис. 3-22). Именно таким путем происходит спаривание почти всех полярных групп, оказывающихся внутри белковой глобулы. Таким образом, водородные связи играют главную роль во взаимодействии разных участков одной полипептидной цепи в свернутой молекуле белка; кроме того, они имеют исключительно важное значение для многих взаимодействий, происходящих на поверхности белковых молекул (рис. 3-23).

Секретируемые белки, или белки клеточной поверхности, часто образуют дополнительные ковалентные связи между разными участками одной и той же полипептидной цепи. Например, образование **дисуль-**

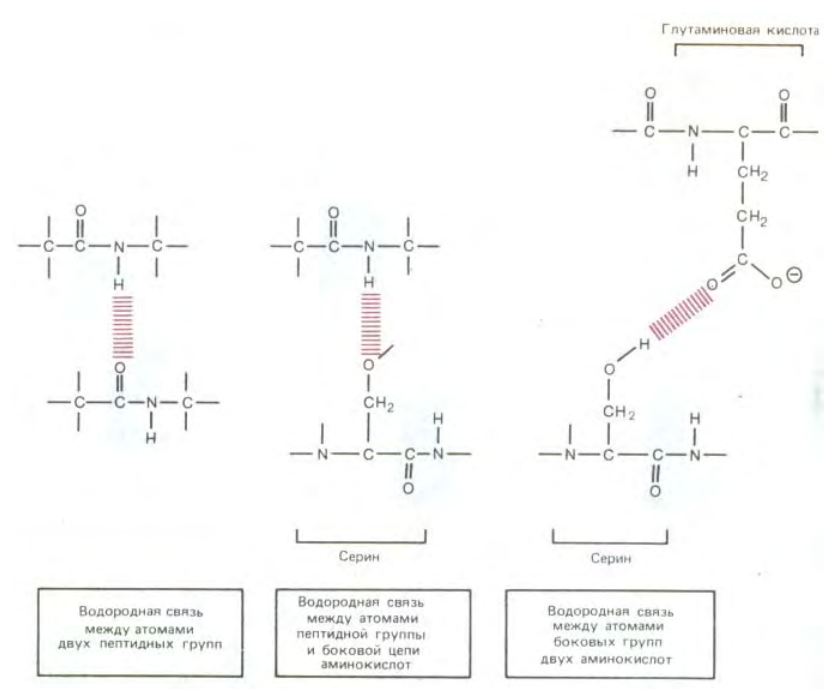


Рис. 3-23. Водородные связи (выделены цветом), которые могут образовываться между аминокислотами в белках. Пептидные связи обозначены серым.

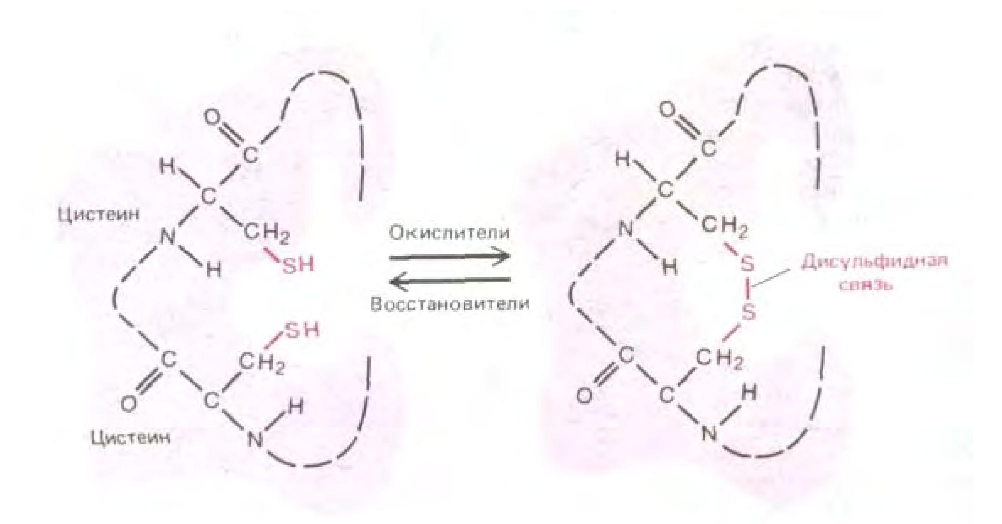


Рис. 3-24. Образование ковалентной дисульфидной связи между соседними остатками цистеина белка.

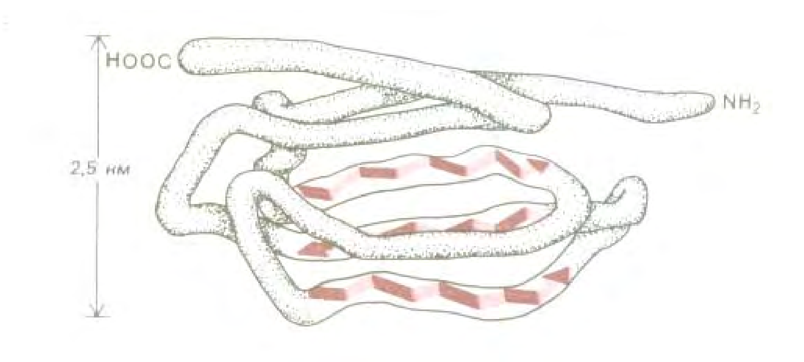
фидных связей (называемых также —S—S-мостиками) между двумя SH-группами цистеина, оказавшимися по соседству в свернутой полипептидной цепи, стабилизирует пространственную структуру внеклеточных белков (рис. 3-24). Для правильного свертывания белков эти связи не нужны, поскольку оно происходит нормально в присутствии восстанавливающих агентов, препятствующих образованию —S—S-мостиков. В самом деле, —S—S-мостики образуются редко (если образуются вообще) у белковых молекул в цитозоле, где высока концентрация агентов, восстанавливающих SH-группы и разрушающих такие мостики (см. разд. 8.6.11).

Общий результат всех индивидуальных взаимодействий аминокислот состоит в том, что большинство молекул белка спонтанно принимает характерную для них конформацию: обычно компактную *глобулярную,* но изредка и вытянутую *фибриллярную.* Сердцевина глобулы образована плотно упакованными, почти как в кристалле, гидрофобными боковыми группами, а полярные боковые группы формируют сложную и нерегулярную наружную поверхность. Специфичность связывания белка с малыми молекулами и другими макромолекулярными поверхностями определяется расположением и химическими свойствами различных атомов на этой сложной поверхности (см. ниже). С химической точки зрения белки - наиболее сложные из известных молекул.

3.3.2. Одни и те же способы укладки цепи постоянно повторяются в разных белках [22]

Хотя аминокислотная последовательность полипептидной цепи и содержит всю необходимую для ее свертывания информацию, мы до сих пор не знаем, как эту информацию прочесть, чтобы по последовательности детально предсказать пространственную структуру белка. В результате нативную конформацию белка можно определить лишь с помощью очень трудоемкого метода *рентгеноструктурного анализа* белковых кристаллов. Этим методом к настоящему времени полностью проанализировано более 100 белков. Специфическая конформация каждого из них столь сложна, что для ее детального описания потребовалась бы целая глава.

При сравнении пространственной структуры различных белков выяснилось, что, хотя конформация каждого белка уникальна, несколько способов укладки цепи постоянно повторяются в отдельных частях макромолекул. Особенно часто встречаются два способа укладки, поскольку они обусловлены регулярным образованием водородных связей между самими пептидными группами, а не уникальными взаимодействиями боковых цепей. Оба способа были правильно предсказаны



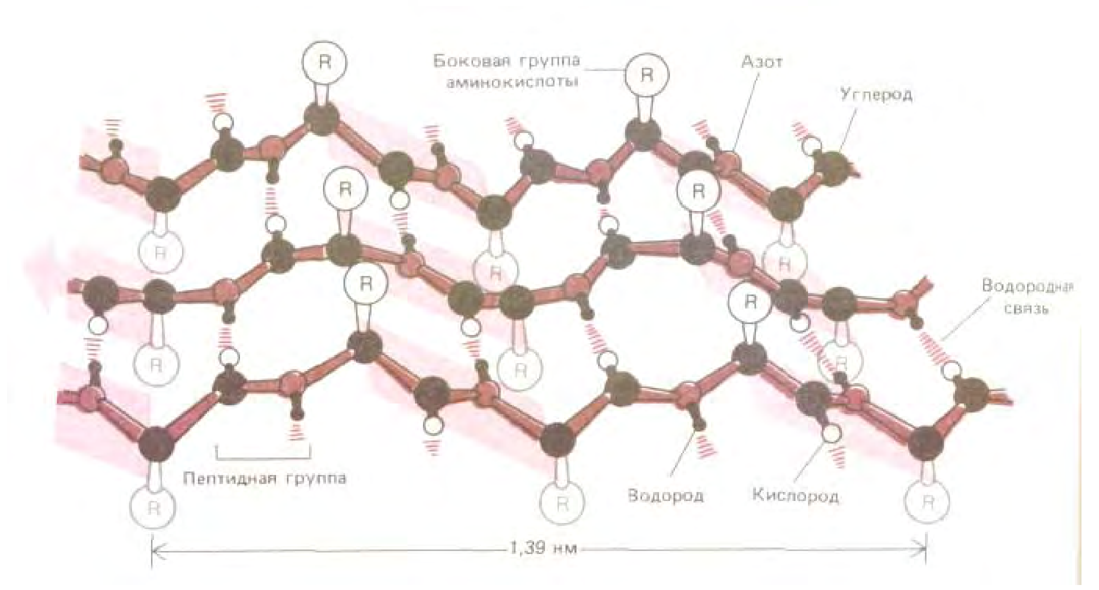


Рис. 3-25. β -Слой - это обычная структура участков глобулярных белков. Сверху показан включающий 115 аминокислот домен молекулы иммуноглобулина. Он состоит из двух β - слоев, уложенных наподобие сандвича, один из которых выделен цветом. Внизу более детально изображен совершенный антипараллельный β -слой. Обратите внимание на то, что каждая пептидная группа образует водородные связи с соседними пептидными группами. β -Слои, встречающиеся в глобулярных белках, обычно несколько менее регулярны, чем показанная здесь структура; часто β - слои оказываются слабо скрученными (см. рис. 3-27).

в 1951 г. с помощью моделей, основанных на результатах рентгеноструктурного анализа шелка и волос. Сейчас эти периодические структуры называют β *-кладчатым слоем* и α *-спиралью.* В β -складчатой конформации находится белок шелка фиброин, α -спираль обнаружена в α -кератине - белке кожи и ее производных (волосах, ногтях и перьях).

Структура β **-складчатого слоя** составляет существенную часть сердцевины (core) большинства (хотя и не всех) глобулярных белков. На рис. 3-25 для примера показана часть молекулы антитела; антипараллельный β - слой этой молекулы образован в результате многократного изгибания полипептидной цепи на 180°, так что направление каждого прямого участка цепи противоположно направлению ближайших соседних участков. Такая структура обладает высокой прочностью, обусловленной образованием водородных связей между пептидными группами соседних участков цепи. Поэтому антипараллельный β -слой часто служит каркасом, на котором собирается глобулярный белок.

α **-Спираль** образуется при закручивании полипептидной цепи вокруг себя с образованием жесткого цилиндра, в котором каждая пептидная группа связывается водородными связями с ближайшими пептидными группами цепи. Многие глобулярные белки содержат короткие участки таких α -спиралей (рис. 3-26); участки трансмембранного белка, который проходит сквозь липидный бислой, также почти всегда являются α -спиралями в силу сжатия, испытываемого им со стороны гидрофобного липидного окружения (см. разд. 6.2.1). В водной среде изолированная α -спираль обычно неустойчива. Однако две одинаковые α -спирали, имеющие повторяющиеся участки неполярных групп цепей, могут последовательно обвиваться вокруг друг друга с образованием чрезвычайно устойчивой структуры. Такие длинные стержневидные структуры обнаружены во многих фибриллярных белках, в частности во внутри-

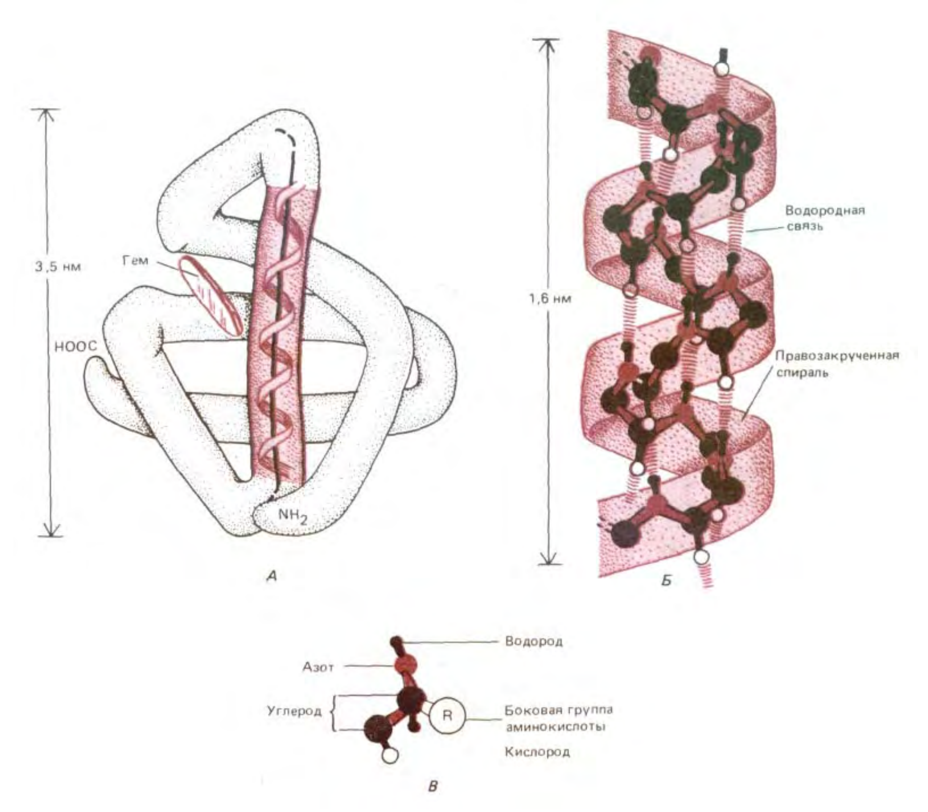


Рис. 3-26. α-Спираль - еще одна общая структура, обычно образующаяся в отдельных участках полипептидной цепи белков. *А.* Показана переносящая кислород молекула миоглобина (длиной 153 аминокислоты); один из α-спиральиых участков выделен цветом. *Б.* Детальное изображение совершенной α-спирали. Как и в β-слое, каждая пептидная группа связана с соседними пептидными группами водородными связями. *В.* Атомы в аминокислотном остатке. Заметим, что в *Б* боковые группы аминокислот для упрощения опущены (они расположены на наружной поверхности спирали. В *В* они обозначены как R на атоме α-углерода каждой аминокислоты (см. также рис. 3-27).

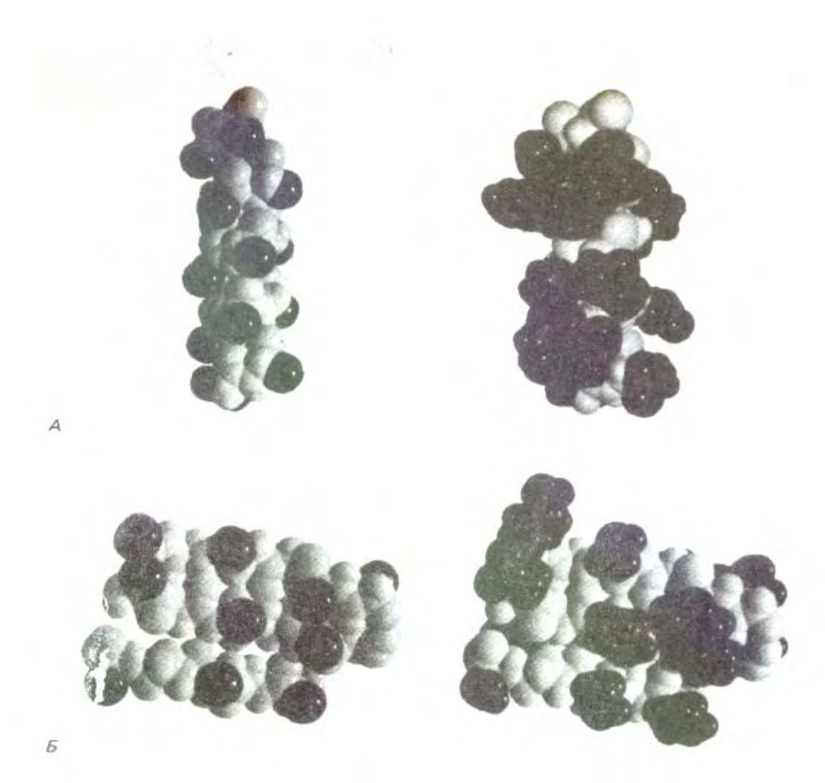


Рис. 3-27. Пространственные модели α-спирали и β-слоя. *Слева* структуры показаны без боковых групп аминокислот, *справа - с* боковыми группами. *А.* α-Спираль (часть структуры миоглобина). *Б.* Участок β-слоя (часть структуры домена иммуноглобулина). На фотографиях слева каждая поверхность цепи представлена только одним черным атомом (группы R на рис. 3-25 и рис. 3-26); вся поверхность цепи показана справа. (С любезного разрешения Richard J. Feldmann.)

клеточных волокнах α-кератина, обусловливающих прочность кожи. Пространственные модели α-спирали и β-складчатого слоя белков с боковыми группами и без них представлены на рис. 3-27.

3.3.3. Молекулы белков характеризуются чрезвычайным разнообразием [23]

Различия в природе боковых групп аминокислот обусловливает замечательное разнообразие возможных типов пространственной структуры белков. Рассмотрим в качестве примера крайних случаев два типа белков, секретируемых клетками соединительной **ткани, - коллаген и эластин,** которые относятся к белкам внеклеточного матрикса. В коллагене три отдельные полипептидные цепи, богатые пролином и содержащие в каждом третьем положении глицин, закручены одна вокруг другой и образуют тройную спираль (см. разд. 14.2.6). Эти молекулы коллагена в свою очередь упаковываются в волокна, в которых соседние молекулы скреплены ковалентными сшивками между соседними лизиновыми остатками. В результате формируются волокна, способные выдерживать исключительно большую нагрузку (рис. 3-28).

Другой предельный случай - ***эластин,*** *в котором относительно* рыхлые и неструктурированные полипептидные цепи образуют благодаря ковалентным сшивкам резиноподобную эластичную сеть, которая дает возможность таким тканям, как артерии и легкие, деформироваться и растягиваться, не причиняя себе вреда. Как показано на рис. 3-29, эластичность обусловлена способностью индивидуальных молекул обратимо разворачиваться под действием растягивающего усилия.

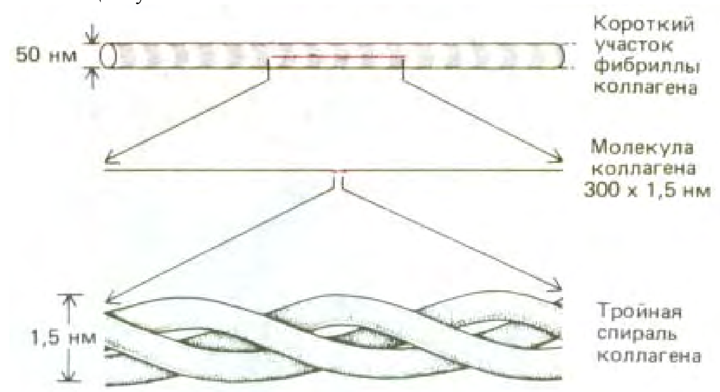


Рис. 3-28. Молекула коллагена - это тройная спираль, образованная тремя вытянутыми белковыми цепями. Множество сшитых вместе стержнеобразных молекул коллагена образует прочные нерастяжимые коллагеновые фибриллы *(вверху),* которые обладают прочностью на растяжение, сравнимой с прочностью стали.

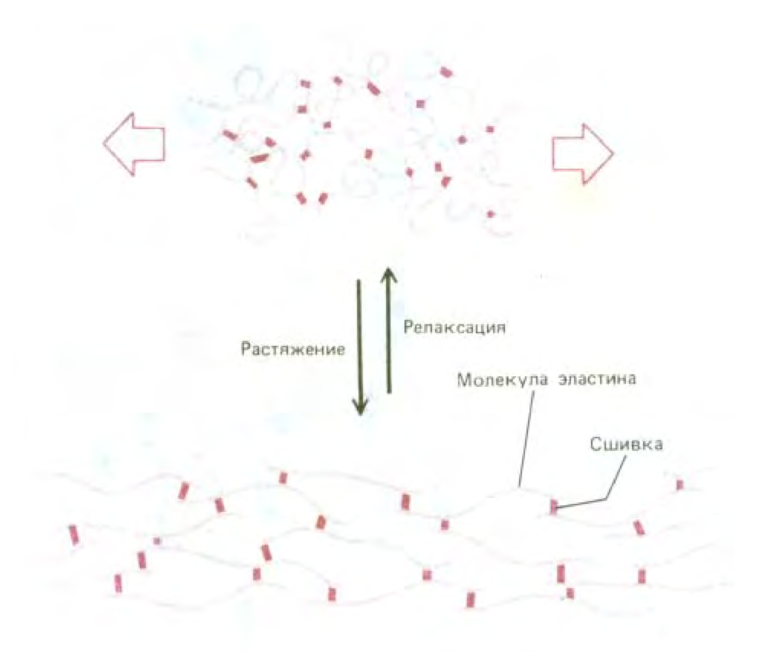


Рис. 3-29. Эластин состоит из полипептидных цепей, образующих благодаря поперечным сшивкам, растяжимые волокна. При растяжении каждая молекула эластина разворачивается, приобретая более протяженную конформацию. Разительный контраст между физическими свойствами эластина и коллагена обусловлен большими различиями в их аминокислотных последовательностях.

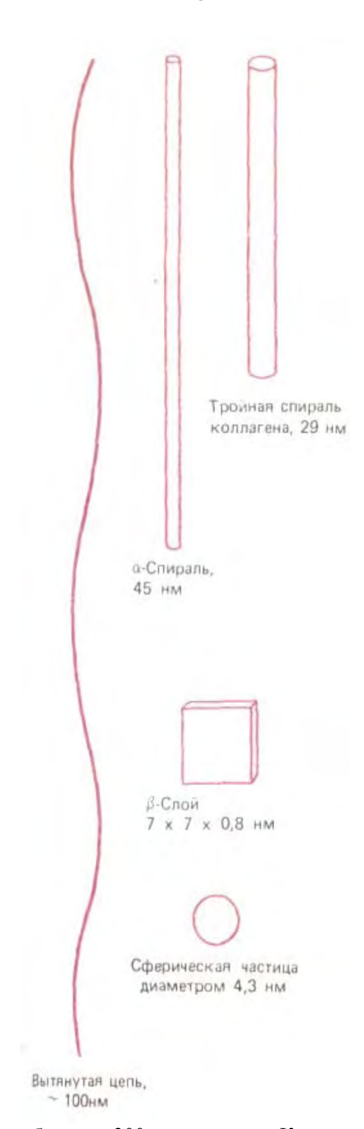


Рис. 3-30. Возможные размеры и форма молекулы белка из 300 аминокислот. Конкретная структура определяется последовательностью аминокислот (D. E. Metzler, Biochemistry, New York; Academic Press, 1977; печатается с изменениями).

Примечательно, что одна и та же химическая структура - аминокислотная цепь - может приобретать самую различную конформацию. Назовем, например, резиноподобный эластин, похожий на стальной трос коллаген, разнообразные глобулярные белки - ферменты, очень различающиеся по форме своей каталитической поверхности. На рис. 3-30 показано, сколь различную форму может в принципе принимать полипептидная цепь длиной в 300 аминокислот. Реальная конформация, как мы уже отметили, полностью зависит от последовательности аминокислот.

3.3.4. Белки имеют различные уровни пространственной организации [24]

Рассматривая структуру белка, полезно различать разные уровни его пространственной организации. Аминокислотную последовательность называют **первичной структурой белка.** Регулярные водородные связи по всей длине непрерывной полипептидной цепи приводят к образованию α-спиралей и β-слоев, которые представляют собой **вторичную структуру белка.** Некоторые комбинации α-спиралей и β-слоев, упакованные вместе, формируют компактно уложенные глобулярные единицы, каждая из которых носит название **белкового домена.** Домены обычно состоят из отрезков полипептидной цепи, содержащих от 50 до 350 аминокислот; по-видимому, они являются теми модульными единицами, из которых строятся белки (см. ниже). Маленькие белки могут содержать только один домен, более крупные белки состоят из нескольких доменов, связанных сравнительно открытыми участками полипептидной цепи. Наконец, отдельные полипептиды могут служить субъединицами для формирования более крупных молекул, часто называемых *белковыми агрегатами,* или *белковыми комплексами.* В таких комплексах субъединицы связаны друг с другом большим числом слабых нековалентных взаимодействий (см. разд. 3.1.1), у внеклеточных белков эти взаимодействия часто стабилизированы дисульфидными связями.

Пространственную структуру белка можно проиллюстрировать несколькими способами. Рассмотрим, например, необычно маленький белок - основной ингибитор трипсина поджелудочной железы, который содержит 58 аминокислотных остатков, упакованных в один домен. Этот белок можно представить в виде стереопары, показывающей все его неводородные атомы (рис. 3-31, А), или в виде тщательно выполненной трехмерной модели, где опущены многие детали (рис. 3-31, Б). Белок можно изобразить и более схематично, без боковых групп и атомов, чтобы сфокусировать внимание на последовательности основной полипептидной цепи (рис. 3-31, В, *Г и Д).* Такие схематические представления очень важны для выявления структуры белков, которые обычно крупнее, чем основной ингибитор трипсина, так как они дают возможность проследить за нерегулярным расположением полипептидной цепи внутри каждого домена (рис. 3-32).

На рис. 3-33 показано, как структура большого белка может быть сведена к разным уровням организации, каждый из которых иерархическим образом строится из предыдущих. Эти уровни возрастающей структурной организации, возможно, соответствуют стадиям свертывания новосинтезированного белка в конечную нативную структуру внутри клетки.

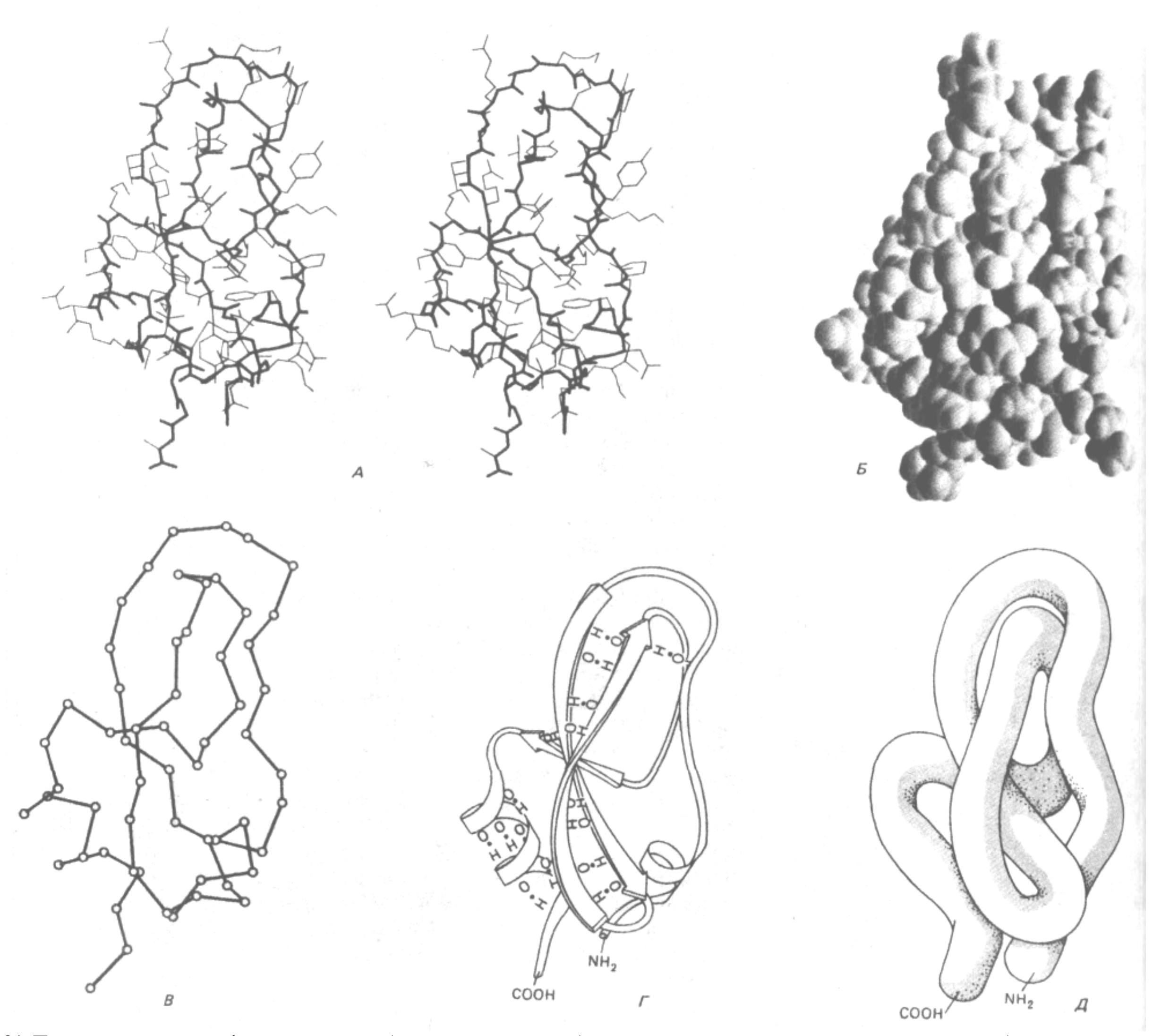


Рис. 3-31. Пространственная конформация малого белка основного ингибитора трипсина поджелудочной железы в пяти обычно использующихся вариантах изображения. *А.* Стереопара, показывающая положение всех неводородных атомов. Основная цепь выделена жирной линией, а боковые цепи - тонкими. *Б.* Пространственная модель, показывающая вандерваальсовы радиусы всех атомов (см. схему 3-1). *В.* Скелетная проволочная модель, составленная из отрезков, соединяющих все атомы α-углерода вдоль полипептидного скелета. *Г.* Ленточная модель, которая представляет все участки регулярных водородных связей либо в виде спиралей (α-спирали), либо в виде набора стрелок (β-слои), указывающих на карбоксил-терминальный конец цепи; в этой модели также показаны водородные связи. *Д.* «Сосисочная» модель, которая демонстрирует расположение полипептидной цепи без всяких деталей. Следует иметь в виду, что сердцевина всех глобулярных белков плотно заполнена атомами, и впечатление пустого пространства вызвано только характером моделей *В, Г и Д. (Б и В с* любезного разрешения Richard J. Feldmann; *А* и *Г - с* любезного разрешения Jane Richardson.)

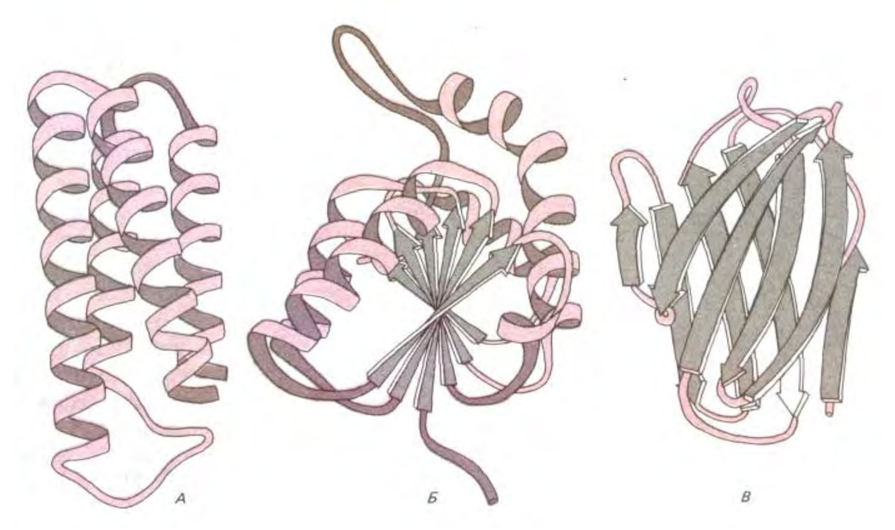


Рис. 3-32. Ленточные модели пространственной структуры некоторых белковых доменов с разной организацией. *А.* Цитохром b_{562}, однодоменный белок, почти целиком состоящий из α-спиралей. *Б.* NAD-связанный домен лактат-дегидрогеназы, состоящий из смеси α-спиралей и β-слоев. *В.* Изменчивый домен одной легкой цепи иммуноглобулина в виде сандвича из двух β-слоев. На этих рисунках α-спирали и соединительные цепи окрашены, а цепи, составленные из β-слоев, изображены серыми стрелками. Обратите внимание, что полипептидная цепь, как правило, пересекает домен два раза, делая резкие изгибы только на поверхности белковой молекулы. (Рисунок любезно предоставлен Jane Richardson.)

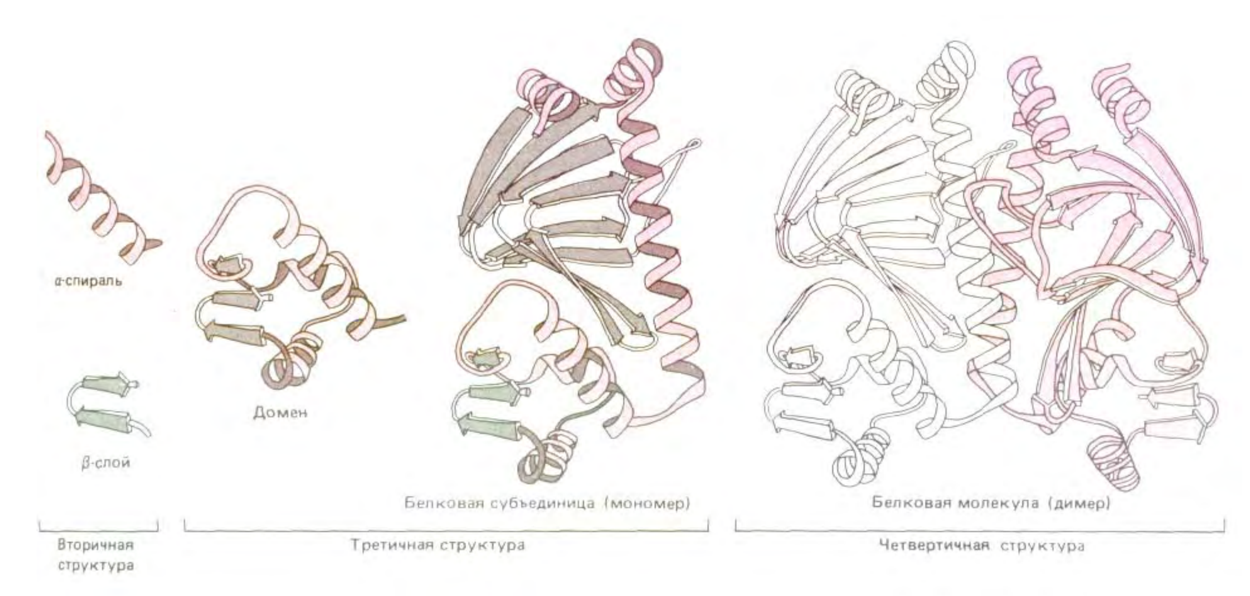


Рис. 3-33. Пространственная структура белка может быть описана в терминах различных уровней свертывания, каждый из которых составлен из структур предшествующего уровня в иерархическом порядке. Такие уровни иллюстрируются на этом рисунке на примере двухдоменного бактериального белка, активирующего катаболизм. Когда большой домен связывается с циклическим AMP, в белке происходит конформационное изменение, дающее возможность малому домену связываться со специфической последовательностью ДНК. Аминокислотная последовательность определяется как первичная структура белка, а первый уровень свертывания полипептидной цепи - как его вторичная структура. Как обозначено внизу рисунка под квадратными скобками, комбинацию второго и третьего уровней свертывания, представленную здесь, обычно называют третичной структурой, а четвертый уровень (комбинация субъединиц) - четвертичной структурой белка. (С изменениями с рисунков Jane Richardson.)

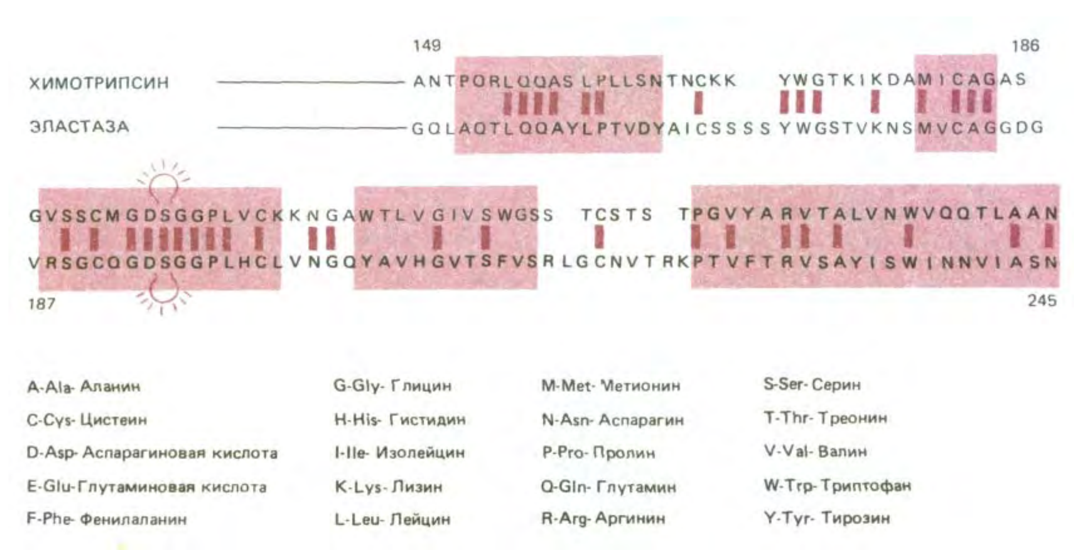


Рис. 3-34. Сопоставление аминокислотных последовательностей двух представителей семейства сериновых протеиназ. Показаны карбоксил-терминальные участки двух белков (от 149 до 245-й аминокислоты). Одинаковые аминокислоты соединены цветными штрихами, а сериновые остатки в активных центрах в положении 195 «высвечены». В участках полипептидных цепей, выделенных цветными прямоугольниками, каждая аминокислота этих двух ферментов в трехмерной структуре занимает одинаковое положение (см. рис. 3-35). *Б.* Стандартные однобуквенные и трехбуквенные обозначения аминокислот. (С изменениями из J. Greer, Proc. Natl, Acad. Sci. USA 77: 3393-3397, 1980.)

3.3.5. Сравнительно немногие потенциально возможные полипептидные цени могут оказаться полезными

Поскольку все 20 аминокислот химически различны и каждая может в принципе занимать в полипептидной цепи любое положение, то для пептида из четырех аминокислот возможны $20 \cdot 20 \cdot 20 \cdot 20 = 160000$ различных цепей, а для полипептида из *n* аминокислот – 20^n цепей. Таким образом, может существовать более 10^{390} различных белков со средней типичной длиной около 300 аминокислот.

Мы, однако, знаем, что лишь очень небольшая часть всех возможных белков примет стабильную пространственную конформацию. Все остальные должны иметь множество различных конформаций с разными химическими свойствами и приблизительно одинаковой энергией. Белки с такими изменчивыми свойствами не могут быть полезными и, следовательно, должны устраняться естественным отбором в ходе эволюции.

Удивительно точная пригнанность структуры современных белков к выполняемой ими функции обеспечивается их способностью свертываться уникальным образом. Последовательность аминокислот не только обеспечивает исключительную стабильность одной из конформаций, но и определяет необходимые для выполнения в клетке каталитической или структурной функции особенности этой конформаций и ее химические свойства. Белки строятся настолько точно, что замена даже нескольких атомов одной аминокислоты может нарушить структуру и привести к катастрофическим изменениям функции.

3.3.6. Новые белки часто возникают в результате незначительных изменений старых [25]

У клетки есть генетические механизмы, обеспечивающие дупликацию, модификацию и рекомбинацию генов в процессе эволюции (см, разд. 10.5.1). Следовательно, если уже какой-нибудь белок с полезными свойствами поверхности раз возникнет, то его основная структура может затем войти в состав многих других белков. В современных организмах различные белки с родственными функциями часто имеют схожую последовательность аминокислот. Считается, что такие семейства белков возникли путем дупликации одного предкового гена и последующего накопления в эволюции мутаций, постепенно обусловивших появление родственных белков с новыми функциями.

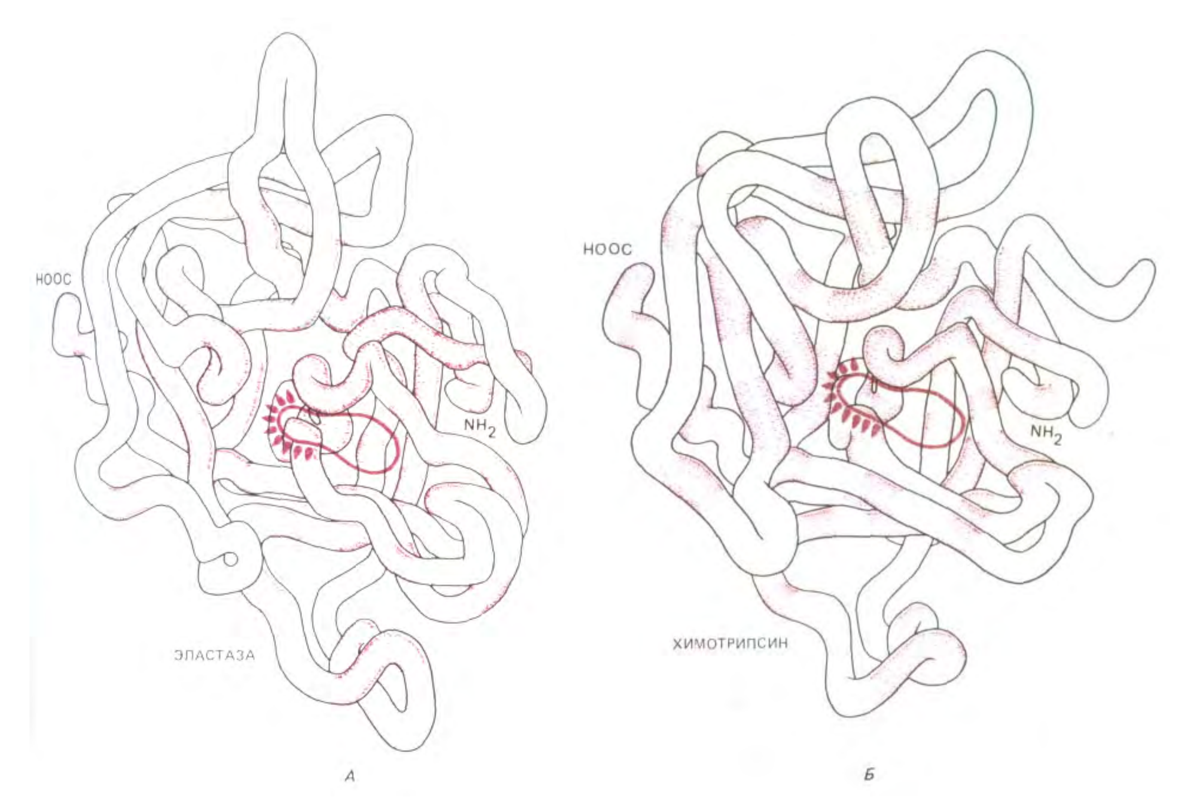


Рис. 3-35. Сравнение пространственной структуры эластазы *(А)* и химотрипсина *(Б). У* этих эволюционно родственных протеиназ одинаковы лишь те аминокислоты, которые расположены в выделенных цветом участках полипептидной цепи. Тем не менее конформации белков очень похожи. Обведены активные центры ферментов; оба активных центра содержат активированный остаток серина (см. рис. 3-47). Молекула химотрипсина имеет несколько (более двух) концов цепи, поскольку она образована протеолитическим расщеплением химотрипсиногена, неактивного предшественника.

Рассмотрим семейство протеолитических (расщепляющих) ферментов, **сериновые протеиназы,** включающие в себя пищеварительные ферменты химотрипсин, трипсин и эластазу, а также многие из факторов свертывания - протеиназ, контролирующих процесс свертывания крови. При сравнении любых двух ферментов этого семейства оказывается, что примерно 40% положений в полипептидной цепи занимают одни и те же аминокислоты (рис. 3-34). Еще более поразительное сходство выявляется при сравнении их конформаций, определенных методом рентгеноструктурного анализа: большинство поворотов и изгибов полипептидных цепей длиной в несколько сот аминокислот оказываются идентичными (рис. 3-35).

Тем не менее разные сериновые протеиназы имеют совершенно различные функции. Некоторые из аминокислотных замен, обусловивших различия ферментов этой группы, по-видимому, были отобраны в процессе эволюции, потому что привели к изменениям субстратной специфичности и регуляторных свойств белков, что в свою очередь породило все многообразие современных функциональных свойств. Другие аминокислотные замены могли быть «нейтральными», т. е. сохранились, потому что не повлияли ни на структуру, ни на функции белка. Поскольку мутирование - процесс случайный, должны были происходить и вредные замены, изменяющие пространственную структуру фермента достаточно сильно, чтобы его инактивировать. Эти измененные варианты были потеряны в процессе эволюции, так как производившие их индивидуальные организмы должны были оказаться в невыгодных условиях и исчезнуть в результате естественного отбора. Поэтому совершенно неудивительно, что клетки содержат целый набор структурно родственных полипептидных цепей, имеющих общих предков, но выполняющих разные функции.

3.3.7. Новые белки часто возникают в результате объединения разных полипептидных доменов [26]

При возникновении в клетке ряда стабильных белковых поверхностей новые поверхности с иной специфичностью связывания могут создаваться в результате объединения двух или более индивидуальных белков путем нековалентных взаимодействий. Для клеток характерно такое объединение глобулярных белков в более крупные функциональные белковые агрегаты: молекулярная масса многих белковых агрегатов достигает 1 млн. и более, хотя молекулярная масса типичной полипептидной цепи составляет всего лишь 40000-50000 (приблизительно 300-400 аминокислот); размер лишь немногих полипептидов втрое превышает эту среднюю величину.

Сходный, но другой способ образования новых белков из существующих полипептидных цепей - это слияние соответствующих последовательностей ДНК таким образом, что образуется ген, кодирующий одну большую полипептидную цепь (см. разд. 10.5.4). Считается, что белки, возникшие этим путем, в разных частях полипептидной цепи свертываются независимо в отдельные глобулярные домены. Такая «мультидоменная» структура характерна для многих белков, и, как

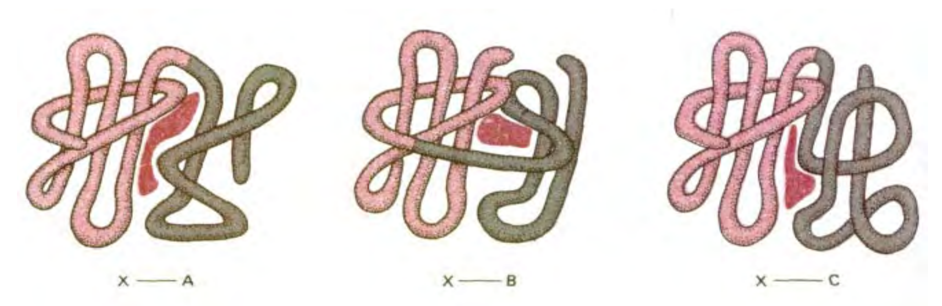


Рис. 3-36. Общий принцип, по которому наложение двух различных белковых поверхностей в процессе эволюции, приводит к появлению белков, которые содержат новые центры связывания для других молекул. Как показано на этом рисунке, лиганд - связывающие центры часто расположены в месте соприкосновения двух белковых доменов.

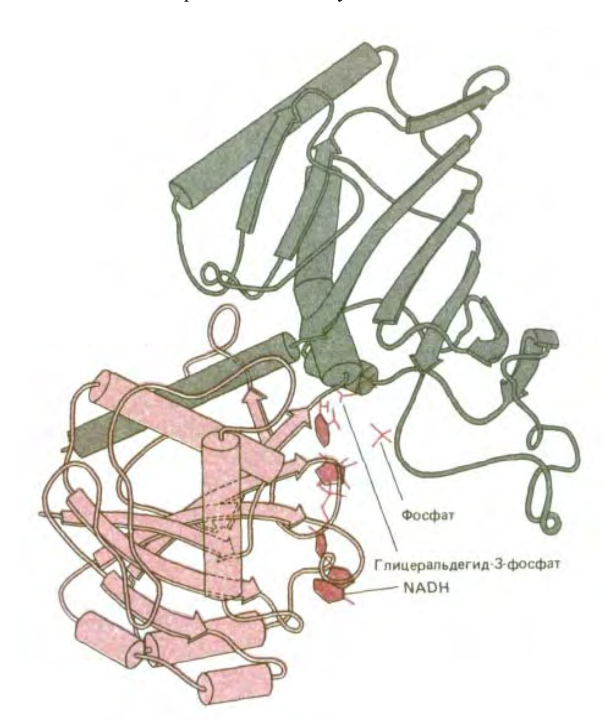


Рис. 3-37. Структура гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфат- дегидрогеназы. Белок состоит из двух доменов (выделены разным цветом). Участки α-спирали представлены в виде цилиндров, а β-слоев- стрелками. Реакция, катализируемая этим ферментом, подробно приведена на рис. 2-21. Заметим, что три центра связывания субстратов расположены в зоне соприкосновения двух доменов. (С любезного разрешения Alan. J. Wonacott.)

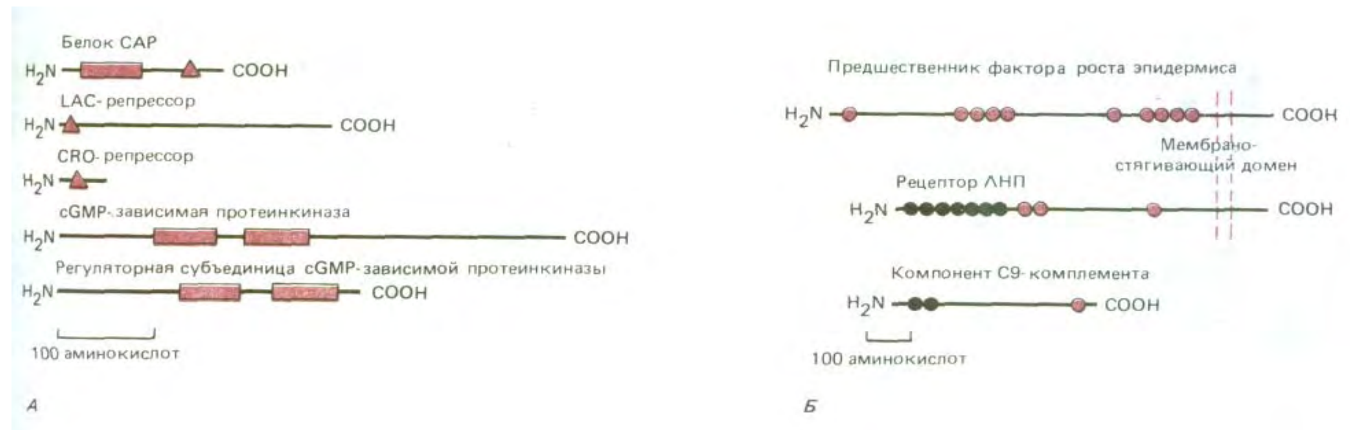


Рис. 3-38. Пример широко распространенной в эволюции белков «перетасовки» блоков белковых последовательностей. Участки белка, обозначенные окрашенными геометрическими фигурами, являются эволюционно родственными, но не идентичными. *А*. Бактериальный САР-белок состоит из двух доменов; один из них (закрашенный треугольник) связывается со специфической последовательностью ДНК, второй - связывает cAMP (см. рис. 3-33). ДНК-связывающий домен родствен ДНК-связывающим доменам многих других белков регуляторных генов, включая белки lac-репрессор и его-репрессор. Кроме того, две копии cAPM-связывающего домена обнаружены в эукариотических киназах, регулируемых связыванием циклических нуклеотидов. *Б*. Представлены два домена, состоящие примерно из 40 аминокислот, каждый из которых встречается в трех больших белках позвоночных. Например, рецептор липопротеина низкой плотности (ЛНП) - это трансмембранный белок из 839 аминокислотных остатков, ответственный за выведение холестерола из клеток. Он содержит много доменов, имеющихся и в других белках, в частности, семь копий цистеин - богатого домена (светлые кружки), участвующих в связывании ЛНП, и три копии такого же размера (окрашенные кружки), функции которых неизвестны.

и следовало ожидать, исходя из рассмотренных выше эволюционных предпосылок, функционально важные центры связывания часто оказываются расположенными на границе разных доменов (рис. 3-36). На рис. 3-37 показана структура конкретного мультидоменного белка.

Другой путь повторного использования аминокислотной последовательности особенно распространен среди длинных фибриллярных белков, таких, как коллаген (см. рис. 3-28). В этом случае их структура формируется из многократных внутренних повторов предковой аминокислотной последовательности. Ясно, что сведение вместе аминокислотных последовательностей путем объединения ранее существовавших кодирующих последовательностей ДНК, является более эффективной стратегией для клетки, чем получать новые белковые последовательности в результате случайных мутаций ДНК.

3.3.8. Структурные гомологии могут помочь в определении функций вновь открытых белков [27]

Развитие методов быстрого секвенирования молекул ДНК сделало возможным определение аминокислотных последовательностей многих белков и нуклеотидных последовательностей соответствующих генов (см. разд. 4.6.6). Постоянно пополняемая «база данных белков» обрабатывается на компьютере для поиска возможных гомологии последовательностей между вновь секвенированным белком и изученными ранее. В настоящее время определена последовательность небольшого числа белков эукариотических организмов, при этом часто оказывается, что вновь секвенированный белок является гомологом уже известного белка в пределах какого-то участка его длины. Отсюда следует, что большинство белков, видимо, произошло от ограниченного числа предковых типов. Как и предполагалось, в последовательностях многих больших белков часто видны признаки того, что они возникли путем объединения ранее существовавших доменов в новых комбинациях, так называемого процесса «тасования доменов» (рис. 3-38).

Установление гомологии доменов также может быть полезным в другом аспекте. Определить пространственную структуру белка намного труднее, чем определить аминокислотную последовательность. Однако конфигурация домена вновь секвенированного белка может быть «отгадана», если он гомологичен домену белка, конформация которого ранее была определена методом рентгеноструктурного анализа. Часто можно с приемлемой точностью определить структуру нового белка, предполагая, что повороты и изгибы полипептидной цепи в двух белках будут одинаковыми, даже если есть отличия в аминокислотной последовательности.



Рис. 3-39. Схема образования димера из идентичных белковых субъединиц. Если центр связывания узнает сам себя, димеры будут симметричными. Эти пары часто в дальнейшем объединяются с другими субъединицами с образованием тетрамеров и более сложных ансамблей.

Такие сравнения белков важны еще и в том отношении, что сходные структуры часто предполагают и сходные функции. Можно избежать многолетних экспериментальных исследований, установив гомологию аминокислотной последовательности с белком, функция которого известна. Например, такие гомологии последовательностей впервые указали на то, что некоторые регуляторные гены клеточного цикла дрожжей и некоторые гены, вызывающие раковое перерождение клеток млекопитающих, кодируют протеинкиназы. Таким же способом было определено, что многие из белков, контролирующих морфогенез у плодовой мушки *Drosophila,* являются белками регуляторного гена, а один белок, участвующий в морфогенезе, был идентифицирован как сериновая протеиназа.

Каждый год эта база данных пополняется все новыми сведениями о белковых последовательностях, что увеличивает вероятность обнаружения полезных гомологии. Таким образом, сравнение аминокислотных последовательностей белков будет становиться все более важным инструментом клеточной биологии.

3.3.9. Белковые субъединицы способны к самосборке в большие клеточные структуры [28]

Принцип, позволяющий белковым доменам ассоциировать с образованием новых центров связывания, «работает» и при сборке значительно более крупных клеточных структур. Надмолекулярные структуры, такие, как ферментные комплексы, рибосомы, белковые волокна, вирусы и мембраны, не синтезируются в виде единых гигантских молекул, связанных ковалентными взаимодействиями, а собираются в результате нековалентной агрегации макромолекулярных субъединиц.

Использование субъединиц для построения больших структур имеет несколько преимуществ: 1) для построения большой структуры из многократно повторенных субъединиц меньшего размера требуется меньше генетической информации; 2) поскольку субъединицы связаны между собой многими сравнительно слабыми связями, их сборка и диссоциация легко поддаются контролю; 3) сборка структуры из субъединиц позволяет сводить к минимуму количество ошибок, так как функционирование специального механизма корректирования в процессе сборки может устранять испорченные субъединицы.

3.3.10. Одинаковые белковые субъединицы могут взаимодействовать с образованием геометрически регулярных структур [29]

При наличии в белке центра связывания, комплементарного какому-либо участку на его собственной поверхности, белок будет самопроизвольно агрегировать. В простейшем случае центр связывания узнает сам себя, и в результате образуется симметричный димер. Многие ферменты и другие белки образуют такие димеры, которые часто в свою очередь служат субъединицами для формирования более крупных агрегатов (рис. 3-39 и рис. 3-40).

Если центр связывания белка комплементарен другому участку на своей поверхности, то образуется цепь субъединиц. При некоторых взаимных ориентациях двух участков связывания цепь замкнется сама на себя и рост прекратится. В результате образуется кольцо из двух, трех, четырех или большего числа субъединиц (рис. 3-41). В более общем случае получится бесконечно длинный полимер из белковых субъединиц. При условии, что все субъединицы связаны друг с другом идентичным

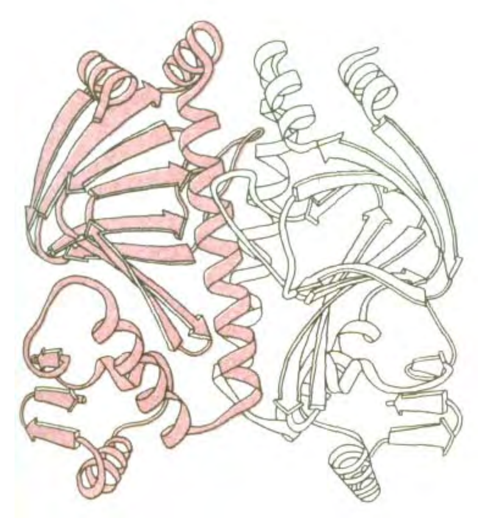


Рис. 3-40. Ленточная модель димера, образованного из двух идентичных белковых субъединиц (мономеров). Представленный белок является бактериальным белком САР, показанным ранее на рис. 3-33 и рис. 3-38, А. (С любезного разрешения Jane Richardson.)

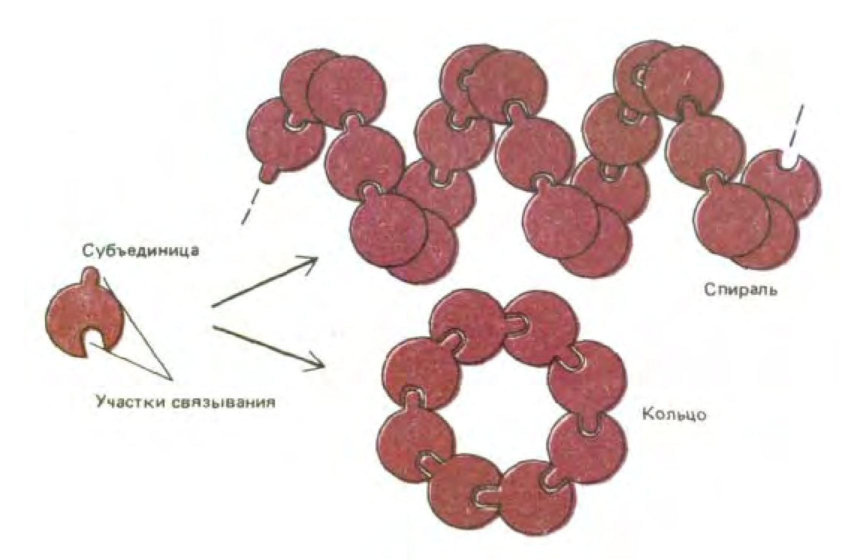


Рис. 3-41. Одинаковые субъединицы при взаимодействии друг с другом могут формировать кольца или спирали. Образование спирали было показано на рис. 3-3, образование кольца вместо спирали происходит, если субъединицы входят друг в друга, останавливая дальнейший рост цепи.

образом, субъединицы в такой цепи расположатся по спирали (см. рис. 3-3). Например, *актиновая нить* представляет собой спиральную структуру, собранную из одинаковых субъединиц глобулярного белка актина; актиновые нити являются основными компонентами цитозоля большинства эукариотических клеток. Когда особенно важна механическая прочность, надмолекулярные агрегаты обычно строятся не из глобулярных, а из фибриллярных субъединиц, поскольку фибриллярные субъединицы, обвиваясь вокруг друг друга в спираль, имеют обширные области для белок-белкового взаимодействия (рис. 3-42, *А)*.

Гексагонально упакованные белковые субъединицы могут образовывать плоские слои. Иногда так агрегируют в липидных бислоях специализированные мембранные транспортные белки (см. разд. 6.2.8). При небольшом изменении геометрии субъединиц гексагональный слой превращается в полую трубку (рис. 3-42, Б). Такие цилиндрические трубки участвуют в образовании белковых оболочек некоторых удлиненных вирусов (рис. 3-43).

Образование замкнутых структур - колец, трубок или сферических частиц - дополнительно стабилизирует весь арегат; общее число связей между белковыми субъединицами в этом случае увеличивается. Более того, поскольку такая структура формируется благодаря взаимозависимым кооперативным взаимодействиям, то сборка и разборка могут производиться относительно малыми изменениями, затрагивающими сами субъединицы. Особенно ярко это можно проиллюстрировать на примере белковых оболочек многих простых вирусов, имеющих форму полого шара. Такие оболочки часто собраны из сотен идентичных белковых субъединиц, окружающих и защищающих вирусную нуклеиновую кислоту (рис. 3-43). Структура белков оболочки должна быть особенно гибкой, так как она должна допускать различные типы межсубъединичных контактов, а также обеспечивать изменение упаковки субъединиц при выходе нуклеиновой кислоты в начале цикла размножения вируса.

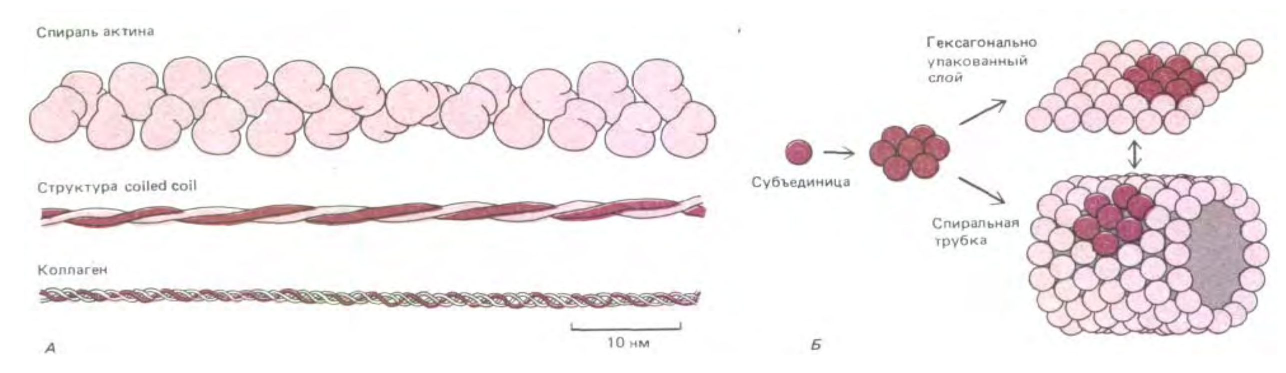


Рис. 3-42. Некоторые структуры, образующиеся при самосборке белковых субъединиц. *А.* Три общих типа спиральных ансамблей белка. В актиновой нити содержится примерно две глобулярные белковые субъединицы на один оборот, а многие другие цитоскелетные белки содержат стержневидные участки, в которых две α-спирали объединяются в структуру "coiled coil". В спирали коллагена три вытянутые белковые цепи объединяются друг с другом на большом расстоянии с образованием очень прочной стержнеобразной структуры. *Б.* Гексагонально упакованные глобулярные белковые субъединицы могут формировать либо плоские структуры, либо трубки.

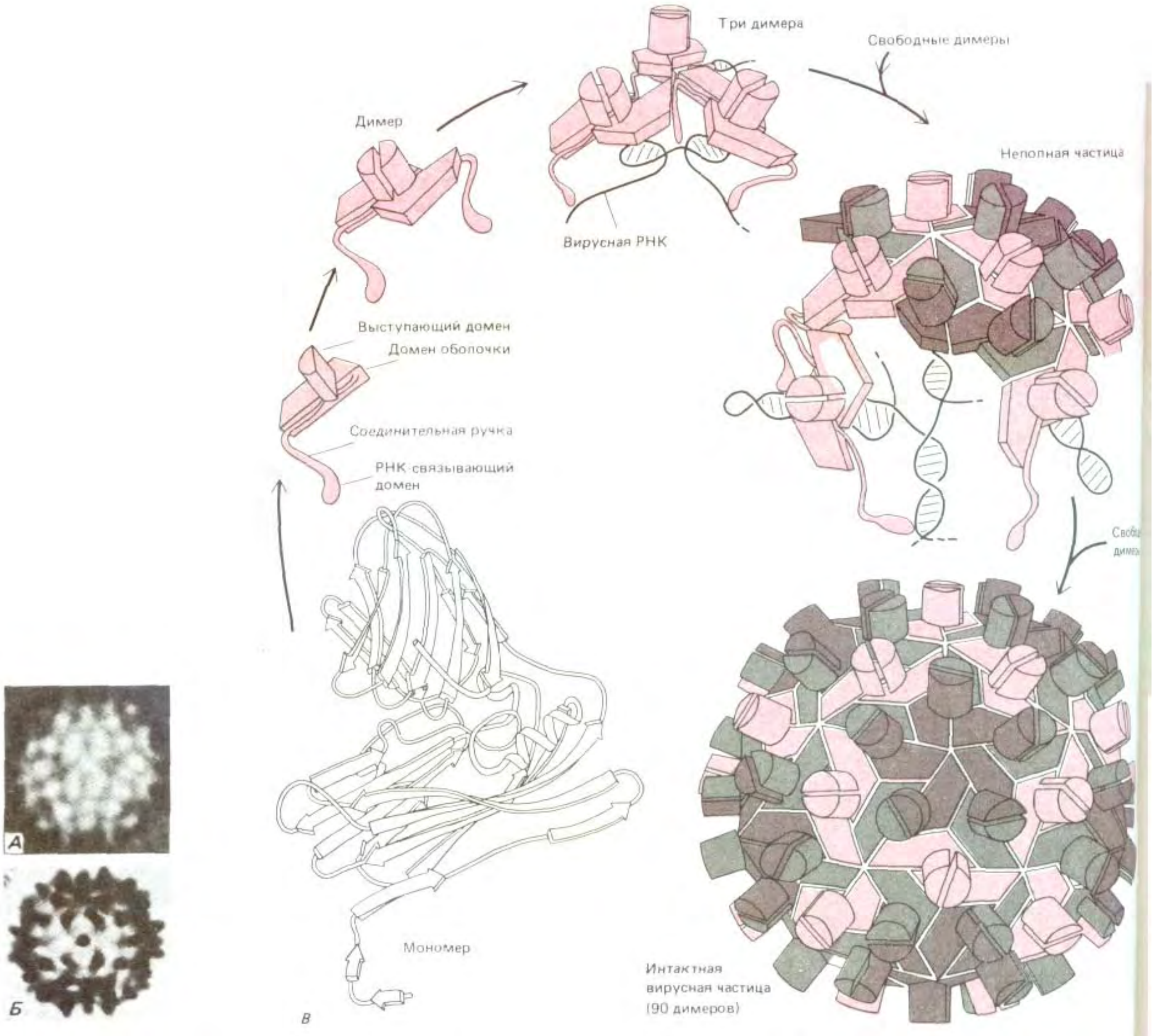


Рис. 3-43. Структура сферического вируса. Во многих вирусах идентичные белковые субъединицы упаковываются с образованием сферической оболочки, которая заключает вирусный геном, состоящий из РНК или ДНК. По геометрическим соображениям симметричным образом могут упаковаться не более 60 субъединиц. Однако если допустимы небольшие отклонения от регулярности, то можно использовать больше субъединиц для образования более крупного капсида. Например, вирус кустистой карликовости томата (TBSV) имеет форму сферы около 33 нм в диаметре. На электронной микрофотографии *(А)* и на схеме *(Б)* можно видеть, что он состоит из более, чем 60 субъединиц. Предполагаемый способ сборки и трехмерная структура по данным рентгеноструктурного анализа этого вируса представлены на *В*. Вирусная частица состоит из 180 идентичных копий капсидного белка (насчитывающих по 386 аминокислот) и генома РНК, включающего 4500 нуклеотидов. Чтобы сформировать такой крупный капсид, белок должен быть способен упаковываться тремя несколько различными способами (обозначены разным цветом). (Рисунки выполнены Steve Harisson; электронные микрофотографии - с любезного разрешения John Finch.)

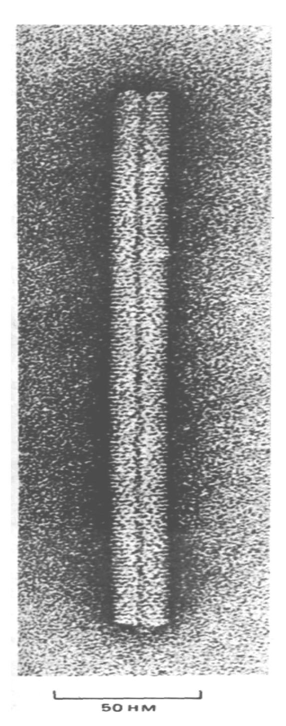


Рис. 3-44. Электронная микрофотография вируса табачной мозаики (ВТМ). Вирус состоит из одной длинной молекулы РНК, окруженной плотно уложенной спиралью из идентичных белковых субъединиц, образующих цилиндрическую оболочку. Очищенная РНК и белок оболочки при смешивании в пробирке самопроизвольно образуют полностью инфекционные вирусные частицы. (С любезного разрешения Robley Williams.)

3.3.11. Самособирающиеся структуры могут состоять из различных белковых субъединиц и нуклеиновых кислот [30]

Многие белковые клеточные структуры, такие, как вирусы и рибосомы, построены из белковых субъединиц и молекул РНК или ДНК. Информация о сборке таких сложных агрегатов заключена в строении самих макромолекулярных субъединиц и в соответствующих условиях изолированные субъединицы могут самопроизвольно собираться в пробирке в конечную структуру. Впервые возможность самосборки большого макромолекулярного агрегата из отдельных компонентов была обнаружена у *вируса табачной мозаики (ВТМ).* Этот вирус представляет собой длинный стержень, в котором белковый цилиндр окружает спиральную сердцевину из РНК (рис. 3-44 и рис. 3-45). Если очищенную вирусную РНК и белковые субъединицы смешать в растворе, они агрегируют с образованием полностью активных вирусных частиц. Процесс самосборки оказался неожиданно сложным: он сопряжен с образованием особых промежуточных структур - двойных белковых колец, присоединяющихся к растущей ободочке вируса.

Другой пример макромолекулярного арегата, структура которого после диссоциации на отдельные компоненты восстанавливается, - это рибосома бактерий. Бактериальные рибосомы состоят приблизительно из 55 различных белковых молекул и трех различных молекул РНК (см. разд. 5.1.8). Если инкубировать в пробирке в соответствующих условиях все индивидуальные компоненты, то они самопроизвольно соберутся в рибосому. Важнее всего то, что такие реконструированные рибосомы способны осуществлять биосинтез белков. Реконструкция рибосом, как и предполагалось, происходит упорядоченно: сначала к РНК присоединяются определенные белки, затем другие белки узнают образовавшийся комплекс и т.д., пока не завершится формирование полной структуры.

До сих пор неясно, каким образом осуществляется регуляция некоторых более сложных процессов самосборки. Оказалось, например, что многие клеточные структуры имеют точно определенную длину, во много раз превышающую длину всех составляющих их макромолекул. Как достигается столь точное ограничение длины, остается загадкой. На рис. 3-46 представлены три возможных механизма такого ограничения. В простейшем случае длинный каркас белка или другой макромолекулы является ограничителем, который определяет размер конечной структуры. Именно такой механизм определяет длину частицы ВТМ, где молекула РНК служит таким стержнем. Аналогично было показано, что белковый каркас определяет длину хвостов некоторых бактериальных вирусов (рис. 3-47).

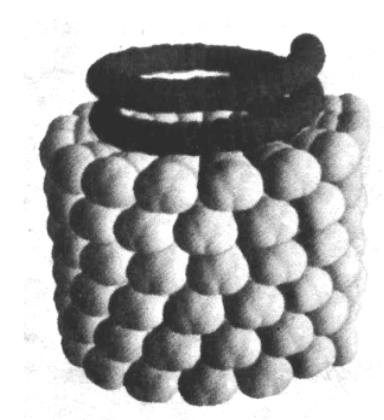


Рис. 3-45. Модель элемента структуры вируса табачной мозаики. Одноцепочечная молекула РНК из 6000 нуклеотидов упакована в белковую оболочку, состоящую из 2130 копий специального белка (каждая его молекула состоит из 158 аминокислотных остатков).

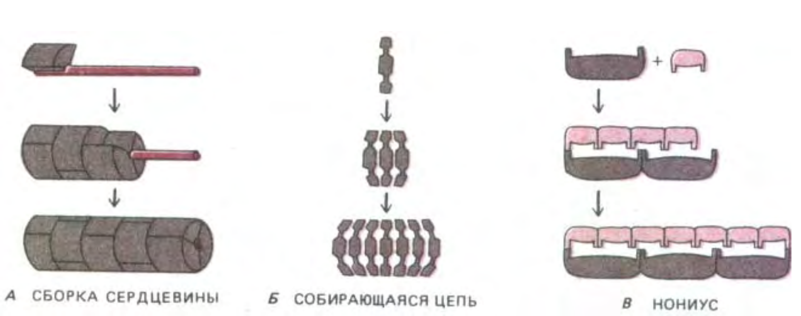


Рис. 3-46. Три возможных способа, с помощью которых большие белковые ансамбли могут поддерживать фиксированную длину: *А*. Объединение вдоль вытянутого каркаса из белка или другой макромолекулы, который служит в качестве «измерительного устройства»; *Б*. Добавление к полимерной структуре дополнительных субъединиц сверх определенной длины требует слишком много энергии и объединение субъединиц прекращается. *В*. Сборка по типу нониуса. Два набора стержневидных молекул отличаются по длине от собранного комплекса и его рост прекратится, когда концы таких молекул в точности совпадут.



Рис. 3-47. Электронная микрофотография бактериофага λ. Конец хвостового отростка фаговой частицы прикрепляется к специфическому белку на поверхности бактериальной клетки, после чего ДНК, плотно упакованная в головке вируса, инъецируется через хвост в клетку. Хвост имеет точную длину, которая определяется при помощи механизма, показанного на рис. 3-46, *А*.

3.3.12. Не все клеточные структуры образуются путем самосборки [31]

Некоторые клеточные структуры, удерживаемые вместе нековалентными связями, не способны к самосборке. Например, митохондрии, реснички или миофибриллы не могут самопроизвольно собираться в растворе из макромолекулярных компонентов, поскольку часть информации для их сборки заложена в специальных ферментах и других клеточных белках, выполняющих функции шаблонов и матриц, но не входящих в состав окончательной структуры. Порой даже маленькие структуры лишены некоторых необходимых для сборки компонентов. Например, при формировании некоторых бактериальных вирусов головка, построенная из одинаковых белковых субъединиц, собирается на временном каркасе, построенном из другого белка. Этого второго белка нет в окончательной вирусной частице, и, следовательно, головка не может самопроизвольно собраться в его отсутствие. Известны другие



Рис. 3-48. Полипептидный гормон инсулин синтезируется в виде белка-предшественника проинсулина, который свертывается нужным образом, а затем расщепляется протеолитическим ферментом. Поэтому после восстановления дисульфидных связей инсулин не может самопроизвольно принять исходную конформацию. Вырезание части полипептидной цепи проинсулина приводит, таким образом, к потере информации, необходимой для самосборки молекулы.

примеры, когда существенной и необратимой стадией процесса сборки является протеолитическое расщепление. Именно так формируются оболочки некоторых бактериальных вирусов и даже некоторые простые белки, в том числе структурный белок коллаген и гормон инсулин (рис. 3-48). На основании этих сравнительно простых примеров можно прийти к выводу, что сборка таких сложных структур, как митохондрия или ресничка, управляется и во времени, и в пространстве другими клеточными компонентами и, кроме того, включает в себя стадии необратимого созревания, катализируемые расщепляющими ферментами.

Заключение

Аминокислотная последовательность белковой молекулы определяет ее пространственную структуру. Конкретная структура полипептидной цепи стабилизируется нековалентными взаимодействиями между ее частями. Аминокислоты с гидрофобными группами стремятся сгруппироваться внутри молекулы, а возникновение локальных водородных связей между соседними пептидными группами приводит к образованию α-спиралей и β-слоев. Многие белки собраны, как из модулей, из небольших глобулярных образований, называемых доменами; малые белки обычно состоят из одного домена, тогда как большие содержат несколько доменов, скрепленных вместе короткими участками полипептидной цепи. При построении новых белков домены изменяются и комбинируются с другими доменами.

Те же силы, которые определяют пространственную структуру белков, ответственны и за образование белковых агрегатов. Белки, имеющие центр связывания, комплементарный их собственной поверхности, могут образовывать димеры, замкнутые кольца, сферические частицы или спиральные полимеры. Смесь множества различных белков, содержащая иногда структурные нуклеиновые кислоты, может самопроизвольно собираться в пробирке в большие сложные структуры. Однако не все клеточные структуры способны к самопроизвольной реконструкции после диссоциации на отдельные компоненты, так как процесс сборки во многих случаях включает необратимые этапы.

3.4. Функции белков [32]

Химические свойства белковых молекул практически полностью зависят от экспонированных на их поверхности аминокислотных остатков, способных образовывать разнообразные слабые связи с другими молекулами (см. разд. 3.1.1). Чтобы взаимодействие белка с другой молекулой (именуемой в дальнейшем **лигандом)** было эффективным, между ними должно одновременно образовываться много слабых связей. Поэтому к белку могут прочно присоединиться лишь те лиганды, которые в точности подходят к его поверхности.

Центр связывания, т. е. участок белка, который взаимодействует с лигандом, обычно имеет вид углубления, сформированного на поверхности белковой молекулы определенным расположением аминокислот. Эти аминокислоты часто принадлежат удаленным друг от друга участкам полипептидной цепи (рис. 3-49) и составляют лишь небольшую долю всех аминокислот белка. Остальные аминокислоты необходимы для поддержания правильной формы белковой молекулы и для создания дополнительных центров связывания, играющих регуляторную роль. Значение внутренней части белка обычно ограничивается лишь тем, что она обеспечивает нужную форму поверхности и необходимую жесткость структуры.

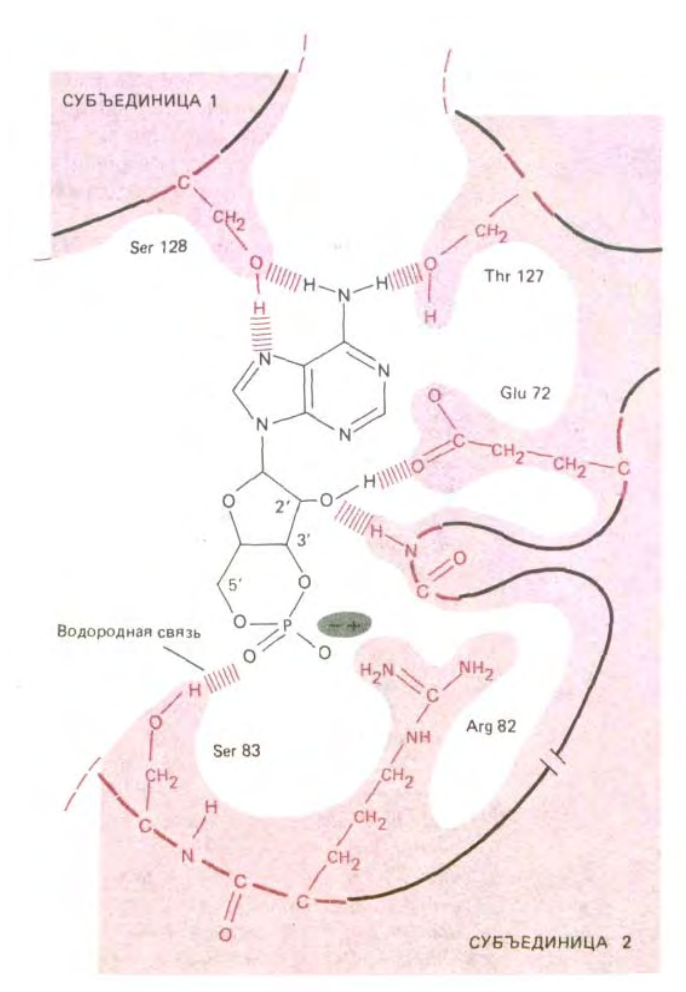


Рис. 3-49. Водородное связывание между САР-белком и его лигандом, cAMP, выявленное с помощью рентгеноструктурного анализа комплекса. Показано, что две идентичные субъединицы димера объединяются с образованием центра связывания (см. также рис. 3-40). (С любезного разрешения Tom Steitz.)

3.4.1. Конформация белка определяет его химические свойства [19, 33]

Соседние аминокислотные остатки поверхности белковой молекулы часто взаимодействуют таким образом, что меняется реакционноспособность боковых групп определенных аминокислот. Такие взаимодействия можно подразделить на несколько типов.

Во-первых, соседние части полипептидной цепи могут взаимодействовать таким образом, что доступ молекул воды к другим участкам поверхности белка будет ограничен. Поскольку молекулы воды стремятся к формированию водородных связей, они должны конкурировать с лигандами за предназначенные для последних боковые группы аминокислот на поверхности белка. Поэтому прочность водородных связей (и ионных взаимодействий) между белком и лигандом значительно больше в том случае, если удалось исключить молекулы воды. На первый взгляд трудно представить себе механизм, способный ограничить доступ к белковой поверхности столь маленькой молекулы, как молекула воды, и не повлиять при этом на связывание самого лиганда. Но молекулы воды благодаря сильной тенденции к образованию водородных связей формируют большие молекулярные сети | (схема 2-1) и индивидуальной молекуле часто бывает энергетически

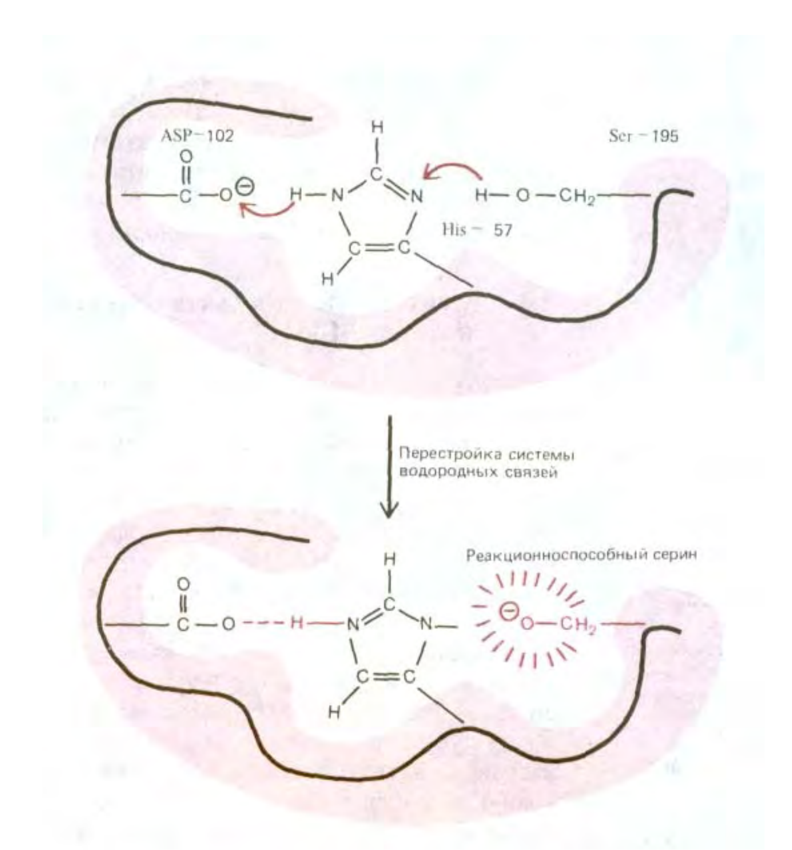


Рис. 3-50. Необычайно реакционно-способная аминокислота в активном центре фермента. Здесь для примера показана «система переноса заряда», обнаруженная у химотрипсина, эластазы и других сериновых протеиназ (см. рис. 3-35). Участок цепи, содержащий аспарагиновую кислоту, индуцирует гистидин к захвату протона у серина 195; это активирует серин к образованию ковалентной связи с субстратом фермента и гидролизу пептидной связи, как показано на рис. 3-53.

невыгодно отрываться от такой сети, чтобы проникнуть в углубление белковой поверхности.

Во-вторых, образование кластера из соседних полярных аминокислот изменяет реакционноспособность их боковых групп. Например, полипептидная цепь может свернуться так, что сблизит ряд отрицательно заряженных аминокислот, несмотря на их взаимное отталкивание. Когда это происходит, резко возрастает сродство каждой из боковых групп к положительно заряженному иону. Боковые группы некоторых аминокислот могут также образовывать водородные связи и таким путем активировать обычно неактивные боковые группы (например, —CH_2OH-группу серина, рис. 3-50). Активированные боковые группы могут вступать в реакции, приводящие к образованию или разрыву определенных ковалентных связей.

Таким образом, поверхность каждой белковой молекулы имеет уникальные химические свойства, зависящие не только от природы аминокислот, расположенных на поверхности, но и от точной взаимной ориентации этих аминокислот. Поэтому даже незначительные изменения конформации белковой молекулы могут привести к резкому изменению ее химических свойств.

В тех случаях, когда химические свойства боковых групп аминокислот не могут обеспечить решение конкретной каталитической задачи, белки прибегают к помощи специальных небелковых молекул. Такие лиганды часто служат в ферментативных реакциях **коферментами** и могут быть столь прочно связаны с белком, что фактически являются его частью. В качестве примера можно назвать: содержащие железо *гемы* в молекуле гемоглобина и цитохромов; *тиаминпирофосфат* в ферментах, участвующих в переносе альдегидной группы; *биотин в* ферментах, участвующих в переносе карбоксильной группы (см. разд. 2.4.3). В процессе эволюции каждый фермент был отобран по определенной химической активности, которую он проявляет в комплексе

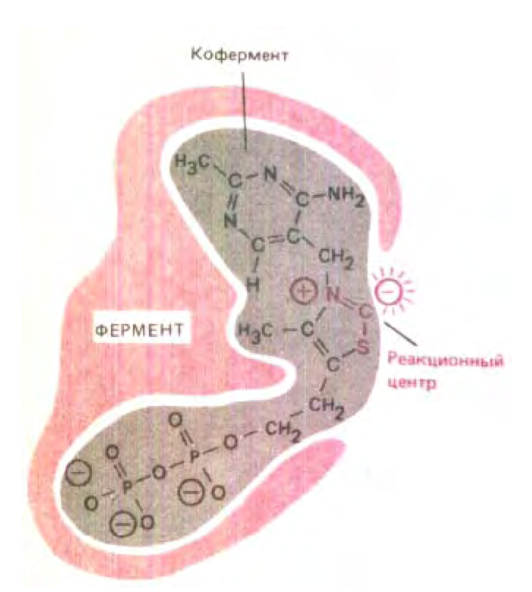


Рис. 3-51. Коферменты, такие, как выделенный здесь серым цветом тиаминпирофосфат, представляют собой небольшие молекулы, которые связываются с поверхностью фермента, обусловливая тем самым способность катализировать определенные реакции. Активность тиаминпирофосфата зависит от «кислого» атома углерода, который с легкостью обменивает связанный с ним атом водорода на атом углерода молекулы субстрата. Другие части молекулы тиаминпирофосфата, видимо, служат «ручками», за которые фермент удерживает кофермент в правильном положении.

с белком. Коферментами часто служат очень сложные органические молекулы, химические свойства которых в комплексе с белком не всегда понятны в деталях. Кроме реакционноспособного центра в состав коферментов нередко входят остатки, связывающие их с соответствующими белками (рис. 3-51). На рис. 3-52, *А* показаны объемные модели двух ферментов, связанных со своими коферментами.

3.4.2. Связывание субстрата - первая стадия ферментативного катализа [34]

Одна из важнейших функций белков состоит в специфическом катализе химических реакций. Лигандом в этом случае служит молекула субстрата, связывание которой ферментом - необходимая предпосылка химической реакции (рис. 3-52, Б). Ферменты способны очень сильно ускорять химические реакции - значительно сильнее, чем любые искусственные катализаторы. Столь высокую эффективность можно приписать нескольким факторам. Во-первых, ферменты увеличивают локальную концентрацию молекул субстрата в каталитическом центре и удерживают соответствующие атомы в ориентации, необходимой для последующей реакции. Но наиболее важное значение имеет тот факт, что часть энергии связывания непосредственно используется для катализа. Дело в том, что молекулы субстрата, перед тем как превратиться в продукты реакции, проходят через ряд промежуточных форм с измененной геометрией и измененным электронным распределением. Свободная энергия всех этих промежуточных форм и особенно наименее стабильных переходных состояний существенно снижена, если молекула связана с поверхностью фермента. Обычно ферменты имеют значительно большее сродство к нестабильным переходным состояниям субстратов, чем к их стабильным формам. Используя энергию связывания, ферменты помогают субстратам принять определенное переходное состояние и таким образом значительно ускоряют одну определенную реакцию.

Некоторые ферменты ковалентно взаимодействуют с одним из своих субстратов. При этом субстрат связывается с аминокислотой или с молекулой кофермента. Такие ферментативные реакции часто происходят в несколько стадий так, что один субстрат захватывается центром связывания и ковалентно связывается, а затем реагирует на поверхности фермента со вторым субстратом (рис. 3-53). К концу каждого реакционного цикла свободный фермент восстанавливается.

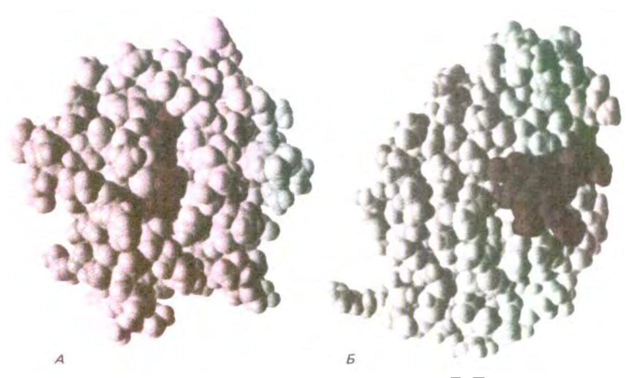


Рис. 3-52. Компьютерные модели. *А*. Цитохром *с* с его простетической группой - гемом. *Б*. Лизоцим яичного белка со связанным олигосахаридом. В обоих случаях связанный лиганд показан в цвете. (С любезного разрешения Richard J. Feldmann.)

Рис. 3-53. Некоторые ферменты образуют временную ковалентную связь со своими субстратами. В приведенном здесь примере карбоксильная группа разорвавшейся полипептидной цепи образует ковалентную связь *с* активированным сериновым остатком протеиназы. После диссоциации несвязанной части полипептида происходит вторая (не показанная здесь) стадия реакции: молекула воды гидролизует вновь образованную ковалентную связь и освобождает оставшуюся часть полипептидной цепи, давая возможность серину в положении 195 вступать в следующую стадию реакции (см. также рис. 3-50).

Способ действия ферментов накладывает ограничение на количество молекул субстрата, которое может быть «обработано» одной молекулой фермента в единицу времени. При увеличении концентрации субстрата скорость образования продукта сначала тоже увеличивается до максимальной величины (рис. 3-54). В этой точке достигается насыщение молекул фермента субстратом, и теперь скорость реакции (обозначаемая V_{max}) зависит только от того, сколь быстро фермент может обработать одну молекулу субстрата. Отношение этой скорости к концентрации фермента, называют **числом оборотов,** которое для многих ферментов составляет около 1000 молекул субстрата в секунду, но в исключительных случаях может достигать значения 10^6 и более.

Другой часто используемой для характеристики ферментов кинетический параметр - это их **константа Михаэлиса** $K_м$, определяемая как концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной (рис. 3-54). Низкое значение $K_ч$ свидетельствует о том, что фермент достигает максимальной скорости катализа при низкой концентрации субстрата и обычно соответствует очень прочному связыванию субстрата ферментом.

3.4.3. Ферменты ускоряют реакции, но не смещают химического равновесия

Сколь бы хитро не был устроен фермент, он не может сделать катализируемую им реакцию более энергетически выгодной. Он не может изменить разницы свободной энергии между начальным субстратом и конечным продуктом реакции. Как и уже обсуждавшееся простое связывание, каждая химическая реакция имеет *положение равновесия,* при котором скорости прямой и обратной реакций равны и, следовательно, не происходит дальнейшего изменения концентраций (см. рис. 3-7). Если фермент ускоряет прямую реакцию А + Б → АБ в 10^8 раз, то и обратную реакцию АБ → А + Б он должен ускорить в 10^8 раз. Отношение скоростей прямой и обратной реакций зависит только от концентраций А, Б и АБ. Положение равновесия остается в точности тем же вне зависимости от того, катализирует фермент реакцию или нет.



Рис. 3-54. При увеличении концентрации субстрата скорость ферментативной реакции *V* увеличивается до тех пор, пока не достигнет максимального значения Vmax. Происходит это при такой концентрации субстрата, при которой уже не остается незанятых молекул фермента, и скорость реакции лимитируется скоростью каталитического процесса на поверхности фермента. Для большинства ферментов концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной $K_м$, отражает прочность связывания субстрата с ферментом. Большие значения $K_м$ соответствуют слабому связыванию, и наоборот.

3.4.4. Многие ферменты заставляют реакции протекать преимущественно в одном направлении, сопрягая их с гидролизом АТР [35].

Живая клетка представляет собой далекую от равновесия химическую систему: продукт каждого фермента обычно быстро расходуется, так как используется в качестве субстрата другим ферментом данного метаболического пути. Еще более важно, что многие из уже описанных в гл. 2 ферментативных реакций сопряжены с расщеплением АТР на ADP и неорганический фосфат (см. разд. 2.4.2). Чтобы это оказалось, возможным, пул АТР в свою очередь должен поддерживаться на уровне, далеком от равновесия, так чтобы отношение концентрации АТР к концентрации продуктов его гидролиза было высоким. Таким образом, пул АТР служит «аккумулятором», поддерживающим постоянный перенос в клетке энергии и атомов по метаболическим путям, определяемым наличными ферментами. Приближение живой системы *к химическому* равновесию равнозначно ее распаду и смерти.

3.4.5. Мультиферментные комплексы повышают скорость клеточного метаболизма [36]

Способность ферментов ускорять химические реакции является решающей для поддержания жизни. В самом деле, клетка должна сопротивляться неизбежному процессу распада, что приводит ее в состояние, далекое от химического равновесия. Если бы скорость ключевых реакций не была выше скорости их обратных реакций, клетка быстро бы погибла. Представление о скорости метаболизма можно получить на основании того факта, что пул АТР типичной клетки млекопитающего за 1-2 мин полностью обновляется (т.е. все молекулы расщепляются и заменяются вновь синтезированными). Значит, за одну секунду каждая клетка использует 10^7 молекул АТР, а весь человеческий организм, таким образом, перерабатывает около грамма АТР в минуту.

Такая высокая скорость клеточных реакций обеспечивается эффективностью ферментных катализаторов. Эффективность многих ключевых ферментов столь высока, что ее дальнейшее увеличение бессмысленно, поскольку катализируемые этими ферментами реакции лимитирует скорость столкновений фермента с субстратами: другими словами, скорость реакций лимитируется диффузией.

Если реакция лимитируется диффузией, то ее скорость будет зависеть от концентрации фермента и субстрата. Поэтому для очень большой скорости ряда последовательных реакций необходимо, чтобы каждый промежуточный продукт и все ферменты присутствовали в высоких концентрациях. Но огромное количество одновременно протекающих в клетке различных реакций накладывает ограничение на достижимые концентрации реагентов. На деле большинство метаболитов присутствует в микромолярных концентрациях (10^{-6} М), а клеточная концентрация большинства ферментов значительно меньше. Как же в таком случае возможно поддерживать очень высокие скорости метаболизма?

Ответ кроется в пространственной организации клеточных компонентов. Скорость реакций можно повысить, не увеличивая концентрации субстратов, если собрать различные участвующие в последовательных реакциях ферменты в большой **мультиферментный комплекс.** При таком способе организации продукт фермента А переходит непосредственно к ферменту Б и т. д. до конечного продукта, причем лимитирующая стадия диффузии отсутствует даже при очень низких внутриклеточных концентрациях промежуточных соединений. Подобные ферментные комплексы встречаются очень часто. Структура одного из них - пи-

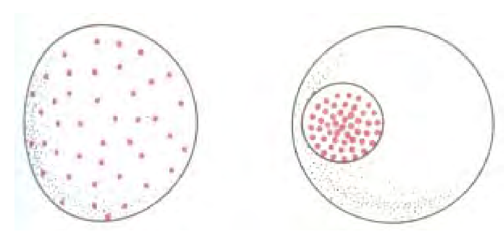


Рис. 3-55. Большое увеличение концентрации взаимодействующих молекул может быть достигнуто заключением их в ограниченный мембраной компартмент в эукариотической клетке.

руват-дегидрогеназы - была показана на рис. 2-40. Эти комплексы вовлечены почти во все аспекты метаболизма, включая центральные генетические процессы синтеза ДНК, РНК и белка. На самом деле возможно, что какое-то незначительное число ферментов эукариотических клеток свободно диффундируют в растворе, однако большинство из них, по-видимому, смогло развить центры связывания, которые концентрируют их с другими ферментами сходных функций в определенных участках клетки, повышая таким образом скорость и эффективность катализируемых ими реакций.

Клетки имеют и другой способ увеличения скорости метаболических реакций, связанный с внутриклеточными мембранами.

3.4.6. Внутриклеточные мембраны ускоряют реакции, лимитируемые диффузией [37]

Обширная сеть внутриклеточных мембран эукариотических клеток по крайней мере двумя способами ускоряет реакции, скорость которых в отсутствие мембран зависела бы от скорости диффузии. Во-первых, мембраны способны изолировать ряд субстратов и действующие на них ферменты в одном компартменте, например, в эндоплазматическом ретикулуме или ядре. Если принять, что каждый такой компартмент занимает около 10% объема клетки, то концентрация реагентов в компартменте может быть в 10 раз выше, чем в такой же клетке без компартментализации (рис. 3-55).

Второй способ, которым мембраны могут увеличить скорость реакции, состоит в том, чтобы ограничить диффузию реагентов только двумя измерениями поверхности самой мембраны. Ферменты и их субстраты, ограниченные двумя измерениями, будут соударяться друг с другом значительно чаще, чем при трехмерной диффузии, даже несмотря на то что скорость диффузии молекул на мембране примерно в 100 раз ниже, чем в водном растворе (рис. 3-56). Такой процесс, видимо, используется в случае ферментов и субстратов, участвующих в синтезе липидных молекул; в этом случае субстраты растворены непосредственно в липидном бислое. Возможно, он также используется для ускорения многих других реакций, в которых участвуют связанные с мембранами ферменты.

Было обнаружено, что подобный механизм «плененной диффузии» увеличивает скорость нахождения некоторыми регуляторными белками геноспецифических последовательностей ДНК, с которыми они связываются, непосредственно на хромосоме. Такие белки имеют слабое сродство ко всем участкам ДНК. Они постоянно наталкиваются на хромосому, «скользят» по ней и таким способом сканируют всю длину ДНК до обнаружения своих специфических центров связывания.

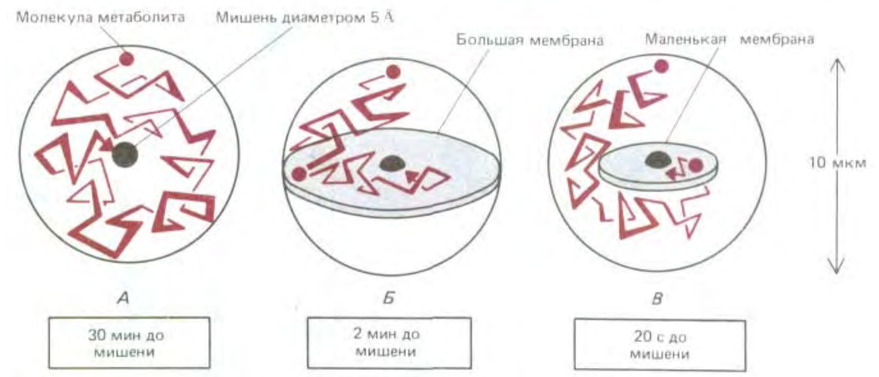


Рис. 3-56. Скорости реакции возрастают, когда из-за наличия мембран трехмерная диффузия заменяется двумерной. Здесь показан результат серии теоретических расчетов. *А.* При диффузии в отсутствие мембран средней молекуле понадобится около 30 мин, чтобы найти любую единичную «мишень» внутри сферической частицы диаметром 10 мкм. *Б.* Если мишень фиксирована на мембране, то время диффузии значительно уменьшается. Средней молекуле требуется около 1 с, чтобы попасть на большую внутреннюю мембрану и около 2 мин, чтобы найти на мембране мишень. *В.* Если уменьшить площадь внутренней мембраны в 10 раз, то молекуле потребуется 10 с, чтобы попасть на мембрану, но поиск мишени теперь займет приблизительно в 10 раз меньше времени, чем в случае *Б.* Таким образом, эффективность соударений в случае *В* почти в 100 раз выше, чем в *А*.

3.4.7. Молекулы белка способны обратимо изменять свою форму [38]

В общем случае естественный отбор способствовал эволюции полипептидов, которые приобретали специфические стабильные конформации. Однако некоторые белковые молекулы, возможно даже большинство из них, имеют две или более слегка различающиеся конформации и, переходя обратимо от одной к другой, могут менять свою функцию. В таком **аллостерическом белке** могут, например, образоваться несколько различных наборов водородных связей с примерно одинаковой энергией, причем каждый такой набор связей требует разных пространственных взаимоотношений между двумя участками полипептидной цепи. Альтернативные стабилизированные конформации, как правило, разделяются нестабильными промежуточными состояниями, так что молекула «мечется» между стабильными конформациями.

Каждая дискретная конформация аллостерического белка имеет несколько отличную от других поверхность и, следовательно, разную способность взаимодействовать с другими молекулами. Часто лишь одна из двух конформаций имеет высокое сродство к конкретному лиганду; в этом случае наличие или отсутствие лиганда определяет принимаемую белком конформацию (рис. 3-57). В тех случаях, когда с различными участками поверхности одного белка могут связываться два различных лиганда, изменение концентрации одного из них меняет сродство белка к другому. Подобные аллостерические изменения играют ведущую роль в регуляции многих биологических процессов.

3.4.8. Аллостерические белки участвуют в регуляции метаболизма [39]

Аллостерические белки участвуют в **регуляции по принципу обратной связи,** которая контролирует поток веществ через метаболические пути (см. разд. 2.5). Например, ферменты, действующие на ранних стадиях какого-либо метаболического пути, почти всегда являются аллостерическими белками, способными существовать в двух альтернативных конформациях. Одна из них - это активная конформация. Белок в активной конформаций связывает в **активном центре** субстрат и превращает его в следующий метаболит данного пути. Другая конформация - неактивная. Белок в этой конформаций прочно связывает конечный продукт того же самого пути в специальном участке поверхности **(регуляторном центре).** По мере накопления конечного продукта, фермент связывается и переходит в неактивную конформацию *(отри-*

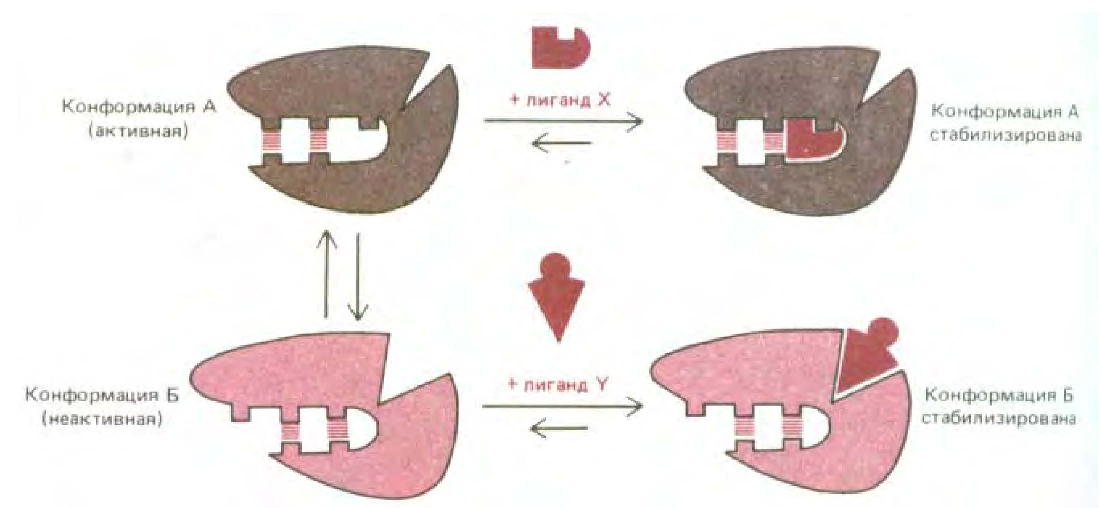


Рис. 3-57. Каждая конформация аллостерического белка может быть стабилизирована предпочтительным связыванием лиганда. Прочное связывание лиганда лишь с одной из возможных конформаций аллостерического белка переводит белок в эту конформацию. Таким образом, высокая концентрация лиганда X будет активировать представленный белок, а высокая концентрация лиганда Y инактивировать его.



Рис. 3-58. Схема, показывающая как конформация одной субъединицы влияет на конформацию соседних субъединиц в симметричном белке, состоящем из идентичных аллостерических субъединиц. Связывание одной регуляторной молекулы лиганда с одной субъединицей изменяет конформацию этой субъединицы, как показано на рис. 3-57. Поскольку такое изменение способствует возникновению тесносвязанной конформации, то связывание первой молекулы лиганда увеличивает сродство других субъединиц к связыванию того же лиганда. Таким образом, фермент может активироваться относительно малым увеличением концентрации регуляторного лиганда (см. рис. 3-59).

цательная обратная связь), которая становится стабильной, в силу того что продукт может связать фермент только в этой форме. В других случаях фермент, участвующий в метаболическом пути, активируется аллостерическим переходом, который происходит при недостатке в клетке продукта этого пути, когда фермент связывает накапливающийся лиганд. В этом случае лиганд связывается с активной формой фермента *(положительная обратная связь)* и такое связывание требует перехода из неактивной в активную конформацию (см. рис. 3-57). Результатом регуляции посредством положительной и отрицательной обратной связи является то, что данный продукт синтезируется в клетке лишь тогда, когда он необходим, и таким путем поддерживаются относительно постоянные концентрации всех метаболитов.

3.4.9. Аллостерические белки совершенно необходимы для клеточной сигнализации [40]

Мы уже отметили, что аллостерические белки (например, те, которые участвуют в регуляции по принципу обратной связи) имеют по меньшей мере два центра связывания - один для субстрата и один или более для регуляторных лигандов. Эти центры занимают различные участки поверхности белка и узнаваемые лиганды могут быть совершенно различными. Поскольку связывание одного лиганда с соответствующим центром может повлиять на другой центр изменением конформации белка, то любой метаболический процесс в клетке может регулироваться продуктом любой другой реакции независимо от его химической природы. Например, синтез и распад гликогена в мышечных клетках регулируются концентрацией связанного Ca^{2+} с помощью аллостерических ферментов, активность которых меняется при изменении концентрации Ca^{2+} в цитозоле (см. разд. 12.4.4).

Аллостерические белки особенно тонко реагируют на сигналы, если, как это часто случается, они работают совместно как идентичные субъединицы в симметричном ансамбле. В таких белках изменение конформации одной субъединицы, вызванное связыванием лиганда, может помочь соседним субъединицам связать тот же самый лиганд (рис. 3-58). В результате относительно малое изменение концентрации лиганда в окружающей среде переключает переход всего ансамбля из неактивной конформации в активную или наоборот. Если лиганд связывается преимущественно с активной конформацией каждой субъединицы фермента, то это приведет к резкому увеличению ферментативной активности, поскольку концентрация лиганда падает (рис. 3-59). Структура одного хорошо изученного аллостерического фермента аспартат-транскарбамоилазы показана на рис. 3-60.

3.4.10. Белки можно заставить изменять конформацию [40, 41]

Белки обеспечивают направленное течение всех происходящих в клетке процессов. Как же можно заставить молекулы самих белков двигаться упорядоченным образом? Прежде чем ответить на этот вопрос, мы должны рассмотреть, каким образом клетка контролирует изменения конформации аллостерических белков. Рассмотрим аллостерический белок, способный принимать две альтернативные конформации - неактивную низкоэнергетическую К и активную высокоэнергетическую К*, энергия которых различается на 4,3 ккал/моль (что приблизительно соответствует энергии образования на поверхности белка четырех водородных связей). При такой разнице энергий вероятность концентрации К будет в 1000 раз превышать вероятность конформации К* (табл. 3-3), и белок почти всегда будет находится в неактивной

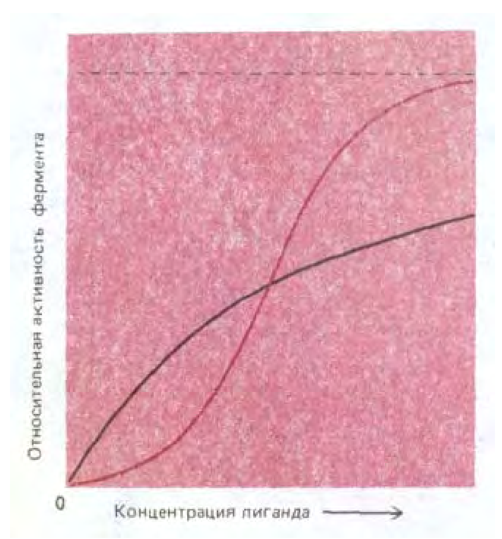


Рис. 3-59. При увеличении концентрации лиганда активность изображенного на рис. 3-58 аллостерического фермента, состоящего из нескольких субъединиц, будет выражаться «сигмоидной» кривой *(цветная кривая)* благодаря кооперативному связыванию молекул лиганда. Напротив, активация аллостерического фермента, состоящего из одной субъединицы, описывается кривой простого насыщения *(черная кривая). Пунктирная прямая* показывает максимальный уровень активности, достигаемый при очень высоких концентрациях лиганда, который будет одинаковым в обоих случаях.

конформации. Есть, однако, два способа заставить белок принять активную конформацию.

Связывание низкомолекулярного лиганда, образно выражаясь, «перетаскивает» молекулу в активную конформацию К*. Если лиганд связывается только с К*, то энергия этой конформации избирательно уменьшается, а энергия К остается неизменной. Поскольку лиганд связывается с белком достаточно слабо (большая часть энергии связывания уходит на удержание подходящей для лиганда формы белка), он с легкостью диссоциирует, и поэтому такое изменение конформации белка полностью обратимо.

Другой способ состоит в использовании дополнительной химической энергии для того, чтобы «толкнуть» белок на изменение конформации К на активную конформацию К*. В этом случае смена конформации почти необратима. Обычно происходит ковалентный перенос фосфата с молекулы АТР на остатки серина, треонина или тирозина белка с образованием ковалентной связи. Предположим, что эта реакция фосфорилирования, направляемая благоприятным гидролизом АТР в ADP создает невыгодное для конформации К отталкивание зарядов. Если это отталкивание уменьшено в активной форме К*, то переход из К в К* будет сильно облегчаться фосфорилированием (рис. 3-61). Регулируемое фосфорилирование, активирующее или подавляющее функционирование специфических белков, - обычное явление в эукариотических клетках (см. разд. 3.2.3); в самом деле, приблизительно одна

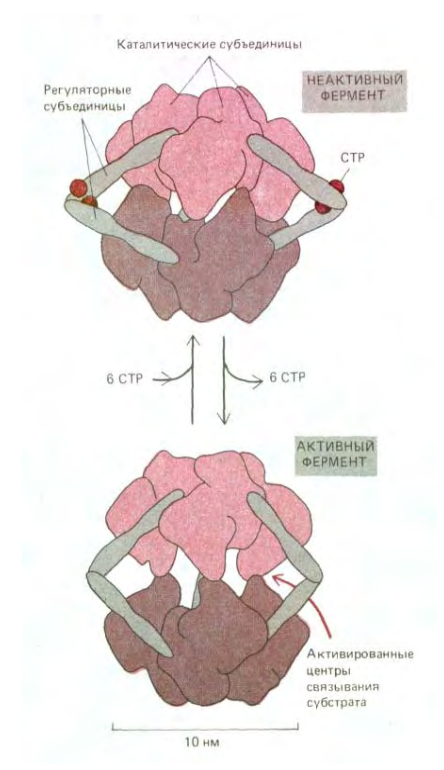


Рис. 3-60. Фермент аспартат-транскарбамоилаза выключается в ответ на связывание цитозинтрифосфата (СТР). Ферментный комплекс состоит из шести каталитических субъединиц и шести регуляторных субъединиц. Структура его неактивной и активной форм определена методом рентгеноструктурного анализа. Каждая регуляторная субъединица может связывать одну молекулу СТР, являющегося одним из конечных продуктов реакции. Эта реакция начинается, когда фермент катализирует образование карбамоиласпартата из карбамоилфосфата и аспарагиновой кислоты. Посредством такой регуляции по типу отрицательной обратной связи фермент защищен от производства большего количества СТР, чем это необходимо клетке. (По данным K. L. Krause, K. W. Volz and W.N. Lipscomb Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1643 1647, 1985.)

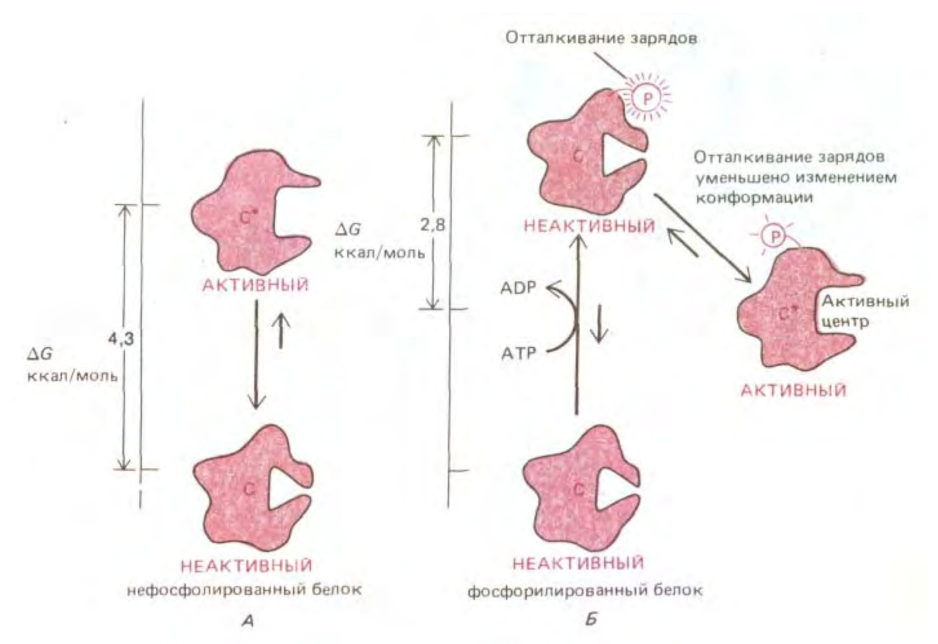


Рис. 3-61. Фосфорилирование с помощью ATP может активировать аллостерический белок. На этом примере неактивная конформация нефосфорилированного белка А в 1000 раз энергетически выгодней из-за разницы свободной энергии 4,3 ккал/моль (см. табл. 3-3). Когда же он фосфорилирован, активная конформация белка Б выгоднее в 100 раз (2,8 ккал/моль), поскольку фосфорилирование создает энергетически невыгодное отталкивание зарядов; этот эффект частично снимается переходом в активную информацию К*. Следовательно, фосфорилирование «толкает» фермент в активную конформацию. В другом случае фосфорилирование может приводить к притяжению зарядов, которое сближает две удаленные части аллостерического белка.

десятая различных белков клеток млекопитающих содержит ковалентно связанный фосфат.

Иногда при добавлении ADP к таким фосфорилированным белкам in vitro наблюдается синтез ATP. Эти данные непосредственно показывают, что существенная часть энергии гидролиза ATP была запасена в напряженной конформации, принимаемой белком при его фосфорилировании. Как же, однако, происходящие с потреблением энергии изменения конформации белка вызывают движения и производят в клетке полезную работу?

3.4.11. Изменения конформации белка, происходящие с затратой энергии, могут быть использованы для выполнения полезной работы [42]

Предположим, что белку необходимо «пройти» вдоль тонкой нити, например, вдоль актиновой нити или молекулы ДНК. На рис. 3-62 показано, как аллостерический белок может выполнить эту задачу, принимая различные конформации. Если ничто не направляет и не упорядочивает конформационные изменения, то изменения формы белка будут полностью обратимы, т. е. белок будет случайно и бесцельно блуждать вдоль нити или волокна.

Поскольку при направленном движении белка совершается работа, то по законам термодинамики на движение должна быть затрачена какая-либо энергия (в противном случае это движение можно было бы использовать для создания вечного двигателя). Поэтому, как бы мы ни модифицировали показанную на рис. 3-62 модель, например, путем введения стабилизирующих ту или иную конформацию лигандов, молекула белка не будет способна к направленному движению, если не снабдить ее источником энергии.

Необходимо каким-либо образом сделать последовательность изменений конформации белка направленной. Например, весь цикл может стать направленным, если какую-либо из стадий сделать необратимой. Один из способов достижения необратимости состоит в использовании уже описанного цикла фосфорилирования - дефосфорилирования. Но

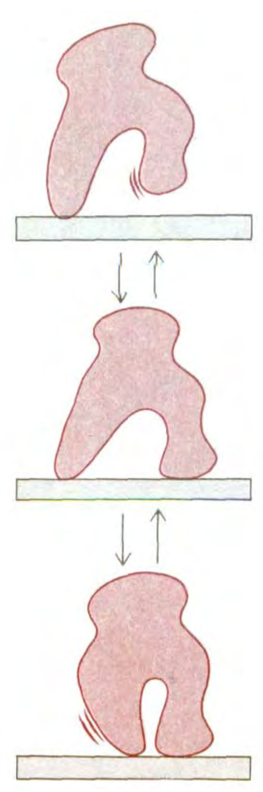


Рис. 3-62. Схематическое изображение «шагающего» аллостерического белка. Хотя три различные конформации белка позволяют ему перемещаться и назад, и вперед по волокну, с которым он связан, постоянное движение в одном направлении невозможно.

аллостерические изменения белков можно направлять и без этого, используя энергию гидролиза АТР. К примеру, в показанной на рис. 3-63 модифицированной схеме циклического перемещения связывание АТР заставляет белок изменить конформацию 1 на конформацию 2. Затем происходит гидролиз АТР, продуктами которого являются связанные ADP и неорганический фосфат (Pi). Этот гидролиз сопровождается переходом конформации 2 в конформацию 3. Наконец, освобождение ADP и Pi позволяет белку вернуться в конформацию 1.

Поскольку на последовательность конформационных переходов 1 2 → 3 → 1 затрачивается энергия гидролиза АТР, то весь цикл при *физиологических условиях становится* практически необратимым (т.е. вероятность образования АТР из ADP и Pi по пути 1 → 3 → 2 → 1 очень низка). Так как необратимость обеспечивает направленность цикла, то молекула белка в нашем схематическом примере будет непрерывно перемещаться вправо. Примерами белков, осуществляющих направленное движение с помощью описанного механизма, могут служить мышечный белок *миозин* и белок *ДНК-геликаза,* играющая важную роль в репликации ДНК.

Многие белковые устройства используют аналогичные механизмы для выполнения упорядоченных движений. Все эти белки способны претерпевать циклические изменения формы, сопровождающиеся гидролизом АТР. Некоторые из них по ходу цикла временно фосфорилируются, другие - нет.

3.4.12. Мембранные аллостерические белки, используя энергию АТР, могут служить молекулярными насосами [43]

Аллостерические белки могут использовать энергию гидролиза АТР не только для создания механического напряжения, но и для осуществления других форм работы, таких, как перекачивание специфических ионов внутрь или наружу клетки. Например, присутствующий в плазматической мембране всех клеток животных аллостерический белок под названием (Na^+, K^+)-зависимая АТРаза в каждом цикле конформационных изменений, сопровождающихся АТР-зависимым фосфорилированием белка, выкачивает из клетки 3 иона Na^+ и накачивает в клетку 2 иона K^+ (см. разд. 6.4.5). Этот насос, работающий за счет энергии АТР, потребляет более 30% энергетических потребностей большинства клеток. Постоянное выкачивание Na^+ и накачивание K^+ приводят к тому, что во внутриклеточной среде содержание Na^+ оказывается ниже, а содержание K^+ выше, чем во внеклеточной среде. Таким путем создаются противоположно направленные трансмембранные градиенты концентраций ионов K^+ и Na^+. Заключенная в этих и других ионных градиентах энергия в свою очередь направляет конформационные изменения множества других мембранных аллостерических белков, заставляя их выполнять полезную для клетки работу.

3.4.13. Белки могут мобилизовать энергию ионных градиентов для выполнения полезной работы [43, 44]

АТР и другие нуклеозидтрифосфаты - крайне важные, но не единственные источники энергии для белков, которые могут использовать ее для совершения полезной работы. Ионный градиент по обе стороны различных клеточных мембран способен запасать и расходовать энергию подобно перепаду воды по разные стороны плотины. Например, созданный (Na^+, K^+)-зависимой АТРазой большой перепад концент-

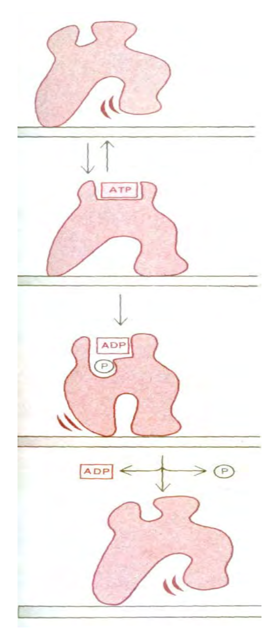


Рис. 3-63. «Шагающий» аллостерический белок, у которого переход между тремя конформациями направляется гидролизом связанной молекулы АТР. Цикл становится практически необратимым, поскольку один из таких переходов сопряжен с гидролизом АТР. *С* помощью повторяющихся циклов белок постоянно движется по волокну вправо.

рации Na^+ с двух сторон плазматической мембраны приводит в движение другие белковые насосы, транспортирующие в клетку глюкозу или специфические аминокислоты.

Мембранные аллостерические насосы, питаемые энергией гидролиза АТР, способны работать в обратном направлении и использовать энергию ионного градиента для синтеза АТР. В самом деле, как мы увидим в гл. 7, именно такой механизм мобилизует у животных энергию градиента протонов $[H^+]$ (направленного поперек внутренней мембраны митохондрий) для синтеза большинства молекул АТР.

3.4.14. Белковые машины играют основную роль во многих биологических процессах [45]

Сложные клеточные процессы, такие, как репликация ДНК или синтез белка осуществляются мультиферментными комплексами, которые работают как сложные «белковые машины». Например, многочисленные белки аппарата репликации ДНК согласованно перемещаются друг относительно друга, что дает возможность всему комплексу, подобно застежке-молнии, быстро двигаться вдоль ДНК (см. разд. 5.3.7).

В таких белковых машинах гидролиз связанных молекул нуклеозидгрифосфата приводит к направленным конформационным изменениям индивидуальных белков, что заставляет группу этих белков координирование перемещаться. Таким же способом соответствующие ферменты движутся прямо в то место, где они необходимы для осуществления определенной реакции, а не ожидают случайных столкновений между отдельными компонентами реакции. Простая механическая аналогия, которая отражает существо таких «высокотехнологичных» решений клеточных потребностей, проиллюстрирована на рис. 3-64. Видимо, большинство основных процессов, происходящих в клетках, осуществляется именно такими крайне сложными многокомпонентными белковыми машинами.

Заключение

Биологические функции белка определяются деталями химических свойств его поверхности. Углубления на поверхности белка, образованные точно расположенными аминокислотными остатками, формируют центры специфического связывания. Ферменты катализируют химические изменения связанных с ними молекул субстратов; при этом для расширения своих возможностей они часто используют маленькие, прочно связанные молекулы коферментов. Скорость ферментативных реакций нередко лимитируется диффузией, однако она может быть выше, если фермент и субстрат оказываются вместе в одном и том же небольшом клеточном компартменте.

Связывание лигандов с поверхностью аллостерических белков обратимо меняет форму последних. Изменения, вызванные присоединением одного лиганда, могут повлиять на связывание второго лиганда, что обеспечивает механизм регуляции различных клеточных процессов. Использование дополнительной химической энергии может внести направленность в изменения формы белка. Например, за счет сопряжения аллостерических изменений с гидролизом АТР белки могут выполнять полезную работу, скажем создавать механическое усилие или перекачивать ионы через мембрану. Могут формироваться и высокоэффективные «белковые машины» - объединение согласованно работающих белков в многоферментные комплексы. Возможно, что белковые ансамбли такого типа осуществляют множество основных биологических реакций.

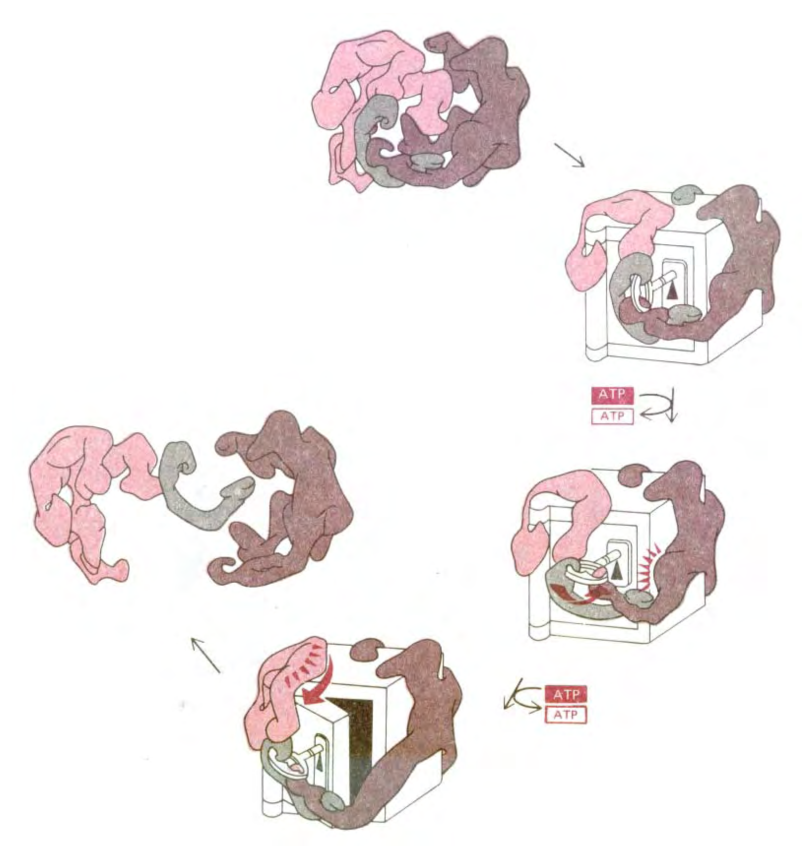


Рис. **3-64**. «Белковая машина». Белковые комплексы часто состоят из одной или более субъединиц, способных к движению, которое направляется энергетически выгодным изменением при связывании молекулы субстрата (см. рис. 3-63). Такого рода движения белка особенно полезны для клетки, если они происходят в большом белковом комплексе, в котором, как представлено на рисунке, активности разных субъединиц скоординированы.

Литература

Цитируемая

1. *Burley S.K., Petsko G. A.* Weakly polar interactions in proteins. Adv. Prot. Chem, **39,** 125-189, 1988.
Cantor C. R., Schimmel P. R. Biophysical Chemistry, Part I and Part III. New York, W.H. Freeman, 1980.
Eisenberg D., Crothers D. Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1979.
Pauling L. The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed. Ithaca, NY, Cornell University Press, 1960.
2. *Fersht A. R.* The hydrogen bond in molecular recognition. Trends Biochem. Sci., **12**, 301-304, 1987.
3. *Cohen C., Parry D.A.D.* a helical coiled coils. Trends Biochem. Sci., **11,** 245-248, 1986.
Dickerson R.E. The DNA helix and how it is read. Sci. Am., **249(6),** 94-111, 1983.
4. *Berg H. C.* Random Walks in Biology. Princeton, NJ, Princeton University Press, 1983.
Einstein A. Investigations on the Theory of Brownian Movement. New York. Dover, 1956.
5. *Lavenda B.H.* Brownian motion. Sci. Am., 252(2), 70-85, 1985.
6. *Karplus M., McCammon J.A.* The dynamics of proteins. Sci. Am., 254(4), 42-51, 1986.

McCammon J. A., Harvey S. C. Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge UK, Cambridge University Press, 1987.
7. *Kirkwood T. W., Rosenberger R. F., Galas D. J., eds.* Accuracy in Molecular Processes: Its Control and Relevance to Living Systems. London, Chapman and Hall, 1986.
Kurland C. G., Ehrenberg M. Growth-optimized accuracy of gene expression. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **16,** 291-317, 1987.
8. *Rosenfield I., Ziff E., Van Loon B.* DNA for Beginners, London: Writers and Readers Publishing Cooperative. New York, Distributed in the USA by W. W: Norton, 1983.
Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. Berlin, Springer, 1984.
9. *Olby R.* The Path to the Double Helix. Seattle, University of Washington Press, 1974.
Stent G. S. Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco, Freeman, 1971.
10. *Watson J.D., Crick F.H.C.* Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature**, 171**, 737-738, 1953.
11. *Felsenfeld G.* DNA. Sci. Am., **253(4),** 58-66, 1985.
Meselson M., Stahl F. W. The replication of DNA in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **44**, 671-682, 1958.
Watson J. D., Crick F. H. C. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, **171**, 964-967, 1953.
12. *Drake J. W.* The Molecular Basis of Mutation. San Francisco, Holden Day, 1970.
Drake J. W., Glickman B. W., Ripley L. S. Updating the theory of mutation. Am. Scientist**, 71**, 621-630, 1983.
Wilson A. C. Molecular basis of evolution. Sci, Am**., 253(4),** 164-173, 1985.
13. *Sanger F.* Sequences, sequences, and sequences. Annu. Rev. Biochem., 57, 1-28, 1988.
Thompson E.O.P. The insulin molecule. Sci. Am., **192(5),** 36-41, 1955.
Yanofsky C. Gene structure and protein structure. Sci. Am., 216(5), 80-94, 1967.
14. *Brenner S., Jacob F.,* Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature, **190**, 576-581, 1961.
Darnell J.E., Jr. RNA. Sci. Am., **253(4),** 68-78, 1985.
15. *Chambon P.* Split genes. Sci. Am., **244(5)**, 60-71, 1981.
Steitz J.A. Snurps. Sci. Am., **258(6),** 58-63, 1988.
Wikowski J. A. The discovery of "split" genes: a scientific revolution. Trends Biochem. Sci., **13**, 110-113, 1988.
16. *Crick F.H.C.* The genetic code: III. Sci. Am., 215(4), 55-62, 1966. The Genetic Code. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **31**, 1965.
17. *Rich A., Kim S.H.* The three-dimensional structure of transfer RNA. Sci. Am., 238(1), 52-62, 1978.
18. *Lake J.A.* The ribosome. Sci. Am., **245(2),** 84-97, 1981.
Watson J.D. Involvement of RNA in the synthesis of proteins. Science, **140**, 17-26, 1963.
Zamecnik P. The machinery of protein synthesis. Trends Biochem. Sci**., 9**, 464-466, 1984.
19. *Alman S., Baer M., Guerrier-Takada C., Viogue A.* Enzymatic cleavage of RNA by RNA. Trends Biochem. Sci., **11,** 515-518, 1986.
Cech T. RNA as an enzyme. Sci. Am., **255(5),** 64-75, 1986.
20. *Cantor C. R., Schimmel P. R.* Biophysical Chemistry. Part I: The Conformation of Biological Macromolecules, Chapter 2 and 5. New York, W.H. Freeman, 1980.
Creighton T.E. Proteins: Structure and Molecular Properties. New York, W.H. Freeman, 1984.
Dickerson R.E., Geisl. The Structure and Action of Proteins. New York, Harper and Row, 1969.
Schulz G. E., Schirmer R. H. Principles of Protein Structure. Chapters 1 through 5. New York, Springer, 1979.
21. *Anfinsen C.B.* Principles that govern the folding of protein chains. Science, **181**, 223-230, 1973.
Baldwin R.I. Seeding protein folding. Trends Biochem. Sci., **11**, 6-9, 1986.
Creighton T.E. Disulphide bonds and protein stability. Bioessays, **8**, 57-63, 1988.
Rupley J. A., Gratton E., Careri G. Water and globular proteins. Trends Biochem. Sci., **8,** 18-22, 1983.
Tanford C. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, 2nd ed. New York, Wiley, 1980.
22. *Doolittle R.F.* Proteins. Sci. Am., 253(4), 88-99, 1985.
Milner-White E.J., Poet R. Loops, bulges, turns and hairpins in proteins. Trends Biochem. Sci., 12, 189-192, 1987.
Pauling L., Corey R. B. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37,** 729-740, 1951.

Pauling L., Corey R. B., Branson H. R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **27,** 205-211, 1951.
Richardson J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. Adv. Protein Chem., **34,** 167-339, 1981.
23. *Scott J. E.* Molecules for strength and shape. Trends Biochem. Sci., **12**, 318-321, 1987.
24. *Hardie D.G., Coggins J.R.* Multidomain Proteins - Structure and Evolution. Amsterdam, Elsevier, 1986.
25. *Doolittle R. F.* The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. Trends Biochem. Sci., **10,** 233-237, 1985.
Doolittle R. F. Protein evolution. In: The Proteins, 3rd ed. (H. Neurath, R. L. Hill eds.), Vol. 4, pp. 1-118. New York, Academic Press, 1979.
Neurath H. Proteolytic enzymec, past and present. Fed. Proc., **44**, 2907-2913, 1985.
26. *Biesecker G. et al.* Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearother-mophilus.* Nature, **266,** 328-333, 1977.
Blake C. Exons and the evolution of proteins. Trends Biochem. Sci., **8**, 11-13, 1983.
Gilbert W. Genes-in-pieces revisited. Science, **228**, 823-824, 1985.
McCarthy A. D., Hardie D. G. Fatty acid synthase: an example of protein evolution by gene fusion. Trends Biochem. Sci., 9, 60-63, 1984.
Rossmann M.G., Argos P. Protein folding. Annu. Rev. Biocem., **50**, 497-532, 1981.
27. *Gehring W.J.* On the homeobox and its significance. Bioessays**, 5**, 3-4, 1986.
Hunter T. The proteins of oncogenes. Sci. Am., **251(27),** 70-79, 1984.
Siidhof T. C. et al. Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EOF precursor. Science, **228**, 893-895, 1985.
Weber I. T., Takio K., Titani K., Steiz T. A. The cAMP-binding domains of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and the catabolite gene activator protein are homologous. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79,** 7679-7683, 1982.
28. *Bajaj M., Blundell T.* Evolution and the tertiary structure of proteins. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **13,** 453-492, 1984.
Klug A. From macromolecules to biological assemblies. Biosci. Rep**., 3,** 395-430, 1983.
Metzler D.E. Biochemistry. New York, Academic Press, 1977. (Chapter 4 describes how macromolecules pack together into large assemblies.)
29. *Caspar D.L.D., Klug A.* Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **27**, 1-24, 1962.
Harrison S. C. Virus structure: high resolution perspectives. Adv. Virus Res**., 28**, 175-240, 1983.
30. *Fraenkel-Conrat H., Williams R. C.* Reconstruction of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. Pro. Natl. Acad. Sci. USA,
41. 690-698, 1955. *Harrison S. C.* Multiple modes of subunit association in the structures of simple spherical viruses. Trends Biochem. Sci**., 9,** 345-351, 1984.
Hendrix R. W. Tail lenght determination in double-stranded DNA bacteriophage. Curr. Top. Microbiol. Immunol., **136**, 21-29, 1988.
Hogle J. M., Chow M., Filman D. J. The structure of polio virus. Sci. Am., **25(3),** 42-49. 1987.
Namba K., Caspar D.L.D., Stubbs G.J. Computer graphics representation of levels of organization in tobacco mosaic virus structure. Science, **227**, 773-776, 1985.
Nomura M. Assembly of bacterial ribisimes. Science, **179,** 864-873, 1973.
31. *Mathews C.K., Kutter E.M., Mosig G., Berget P.B.* Bacteriophage T4, Chapters 1 and 4. Washington, DC, American Society of Microbiologists, 1983.
Steiner D. F., Kemmler W, Tager H. S., Peterson J. D. Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins. Fed. Proc**., 33**, 2105-2115, 1974.
32. *Fersht A.* Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed. New York, W. H. Freeman, 1985.
33. *Chothia C.* Principles that determine the structure of proteins. Annu. Rev. Biochem., **53**, 537-572, 1984.
34. *Fersht A. R., Leatherbarrow R. J., Wells T. N. C.* Binding energy and catalysis. Trends Biochem. Sci., **11**, 321-325, 1986.
Lerner R.A., Tramontano A. Catalytic antibodies. Sci. Am., **258(3),** 58-70, 1988.
Wolfenden R. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. Accounts Chem. Res., **5**, 10-18, 1972.
35. *Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R.M., Hood L.E.* Biochemistry, A Problems Approach, 2nd ed. Menlo Park, CA, Benjymin-Cummings, 1981. (Chapters 9 and 15 and associated problems.)
36. *Barnes S. J., Weitzman P. D. J.* Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. FEBS Lett., **201**, 267-270, 1986.
Reed L. J., Cox D. J. Multienzyme complexes. In: The Enzymes, 3rd ed.

(P.D. Boyer ed.), Vol. 1, pp. 213-240. New York, Academic Press, 1970.

37. *Adam G., Delbruck M.* Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. InB Structural Chemistry and Molecular Biology (A. Rich, N. Davidson eds.), pp. 198-215. San Francisco, Freeman, 1968.
Berg O. G., van Hippel P. H. Diffusion-controlled macromolecular interactions. Anna Rev. Biophys. Biophys. Biochem., **14,** 131-160, 1985.

38. *Cantor C.R., Schimmel P.R.* Biophysical Chemistry. Part III: The Behavior of Biological Macromolecules. Chapters 15 and 17. New York, W. H. Freeman, 1980.
Dickerson R. E., Geis I. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park, CA. Benjamin-Cummings, 1983.
Edelstein S. J. Introductory Biochemistry. San Francisco, Holden-Day, 1973. (Chapter 10 on protein aggregates and allosteric interactions.)
Monod J., Changeux J.-P., Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems. J. Mol. Biol., **6,** 306-329, 1963.

39. *Koshland D.E., Jr.* Control of enzyme activity and metabolic pathways. Trends Biochem. Sci., **9,** 155-159, 1984. Newsholme E. A., Start C. Regulation in Metabolism. New York, Wiley, 1973.

40. *Koch K.-W., Stryer L.* Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. Nature, 334, 64-65, 1988.
Nishizuka Y. Protein kinases in signal transduction. Trends Biochem. Sci., **9**, 163-166, 1984.

41. *Kantrowitz E.R., Lipscomb W.N.* Escherichia coli aspartate transcarbamoylase: the relation between structure and fanction Science, **241,** 669-674, 1988.
Schachman H.K. Can a simple model account for the allosteric transition of aspartate transcarbamoylase? J. Biol. Chem., **263**, 18583-18586, 1988.
Sprang S., Goldsmith E., Fretterick R. Structure of the nucleotide activation switch in glycogen phosphorylase a. Science**, 237**, 1012-1019, 1987.

42. *Hill T.L.* Biochemical cycles and free energy transduction. Trends Biochem. Sci., 2, 204-207, 1977.
Hill T.L. A. proposed common allosteric mechanism for active transport, muscle contraction, and ribosomal translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **64,** 267-274, 1969.
Johnson K.A. Pathway of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: a comparison with actomyosin. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **14,** 161-188, 1985.

43. *Hokin L.E.* The molecular machine for driving the coupled transports of Na^+ and K^+ is an (Na^+ + Reactivated ATPase. Trends Biochem. Sci., **1**, 233-237, 1976.
Kyte J. Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport. Nature, **292**, 201-204, 1981.
Tanford C. Mechanism of free energy coupling in active transport. Annu. Rev. Biochem., **53**, 379-409, 1983.

44. *Nicholls D. G.* Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory. New York, Academic Press, 1982.

45. *Alberts B. M.* Protein machines mediate the basic genetic processes. Trends Genet., **1**, 26-30, 1985.

4. Как изучают клетки?

Клетки очень малы по размеру и сложно устроены: трудно рассмотреть их структуру, трудно определить молекулярный состав и еще труднее установить, как функционируют их отдельные элементы. Для изучения клеток разработано множество экспериментальных методов, возможности которых определяют уровень наших знаний в этой области, Успехи в изучении биологии клетки, включая наиболее удивительные достижения последних лет, как правило, связаны с применением новых методических подходов. Поэтому для понимания клеточной биологии необходимо иметь некоторое представление о соответствующих экспериментальных методах.

В этой главе мы вкратце рассмотрим современные методы, используемые для изучения клеток. Мы начнем знакомиться с теми из них, которые позволяют изучать клетку как единое целое, и затем обратима к анализу составляющих клетку макромолекул. Отправной точкой станет микроскопия, поскольку клеточная биология началась со световой микроскопии, и этот метод до сих пор остается весьма эффективным инструментом исследования, наряду с более современным устройствами для получения изображения, основанными на электронных пучках или иных формах излучения. От пассивного наблюдения мы постепенно перейдем к методам, предполагающим активное вмешательство: рассмотрим, как клетки различных типов могут быть отделены от ткани и при этом сохранять способность расти, узнаем, как клетки можно разрушить, а клеточные органеллы и составляющие их макромолекулы выделить в чистом виде. И наконец, мы изложим суть технологии рекомбинантных ДНК, благодаря которой стало возможным выделять, секвенировать и манипулировать генами и, следовательно, изучать механизмы их действия в клетке.

4.1. Микроскопия [1]

Диаметр типичной клетки животных составляет 10-20 мкм, что в пять раз меньше мельчайшей видимой частицы. Только с появлением совершенных световых микроскопов в начале XIX века удалось установить тот факт, что все ткани животных и растений состоят из отдельных клеток. Это открытие, обобщенное в форме клеточной теории Шлейденом и Шванном в 1838 году, знаменует собой начало клеточной биологии.

Будучи чрезвычайно малыми по размерам, животные клетки к тому же бесцветны и прозрачны; следовательно, открытие их основных структур стало возможным благодаря разработке набора красителей в конце XIX столетия. Именно красители обеспечили достаточный контраст для наблюдения субклеточных структур. Сходная ситуация наблюдалась в начале 40-х годов нашего столетия, когда изобретение мощного электронного микроскопа потребовало новых методов сохра-



Рис. 4-1. Размеры клеток и клеточных компонентов, а также рабочие диапазоны светового и электронного микроскопа, изображенные в логарифмической шкале. В микроскопии принято пользоваться следующими единицами длины: мкм (микрометр) 10^{-6} м, нм (нанометр) - 10^{-9} м, $\overset{0}{A}$ (ангстрем) - 10^{-10} м.

Таблица 4-1. Основные вехи в истории световой микроскопии

1611 - **Кеплер** (Kepler) предложил принцип создания сложного светового микроскопа

1655 - Гук (Hook) использовал сложный микроскоп для описания небольших пор в срезах пробки, названных им «клетками»

1674 - **Левенгук** (Leeuwenhoek) сообщил об открытии им одноклеточных. Спустя 9 лет он впервые увидел бактерии

1833 - **Браун** (Brown) опубликовал свои микроскопические наблюдения над орхидеями, в которых он четко описал ядро клетки

1838 - **Шлейден и Шванн** (Schleiden, Schwann) предложили клеточную теорию, согласно которой структурной и функциональной единицей строения растений и животных является клетка, содержащая ядро

1857 - **Колликер** (Kolliker) описал митохондрии в мышечных клетках

1876 - **Аббе** (Abbe) проанализировал влияние дифракции на формирование изображения и показал возможность усовершенствования конструкции микроскопа

1879 - **Флемминг** (Flemming) с большой точностью описал поведение хромосом во время митоза у животных клеток

1881 - **Ретциус** (Retzius) наиболее подробно описал многие ткани животных. В течение следующих 20 лет он, Кахал (Cajal) и другие гистологи разработали методы окрашивания тканей и заложили основы микроскопической анатомии

1882 - **Кох** (Koch) для окрашивания микроорганизмов использовал анилиновые красители и идентифицировал бактерии, вызывающие туберкулез и холеру. В течение последующих 20 лет другие бактериологи, в том числе **Клебс и Пастер** (Klebs, Pasteur), выявили и описали возбудителей многих болезней, изучая окрашенные препараты под микроскопом

1886 - **Цейсе** (Zeiss), используя идею **Аббе** (Abbe), изготовил серию линз. Благодаря этому усовершенствованию, микроскописты смогли различать структуры, размеры которых были соизмеримы с теоретическим пределом разрешения для видимого света

1898 - **Гольджи** (Golgi), окрашивая клетки азотнокислым серебром, впервые наблюдал и описал аппарат Гольджи

1924 - **Лакассань** (Lacassagne) и его сотрудники разработали первые методы радиоавтографии для выявления радиоактивного полония в биологических образцах

1930 - **Лебедев** разработал и создал первый интерференционный микроскоп. В 1932 г. **Зернике** (Zernicke) изобрел фазово-контрастный микроскоп. Эти два изобретения позволили наблюдать неокрашенные живые клетки и изучать их строение

1941 - **Кунс** (Coons) для выявления клеточных антигенов использовал антитела, связанные с флуоресцирующими красителями

1952 - **Номарский** (Nomarski) разработал и запатентовал систему дифференциального интерференционного контраста для светового микроскопа, которая до сих пор носит его имя

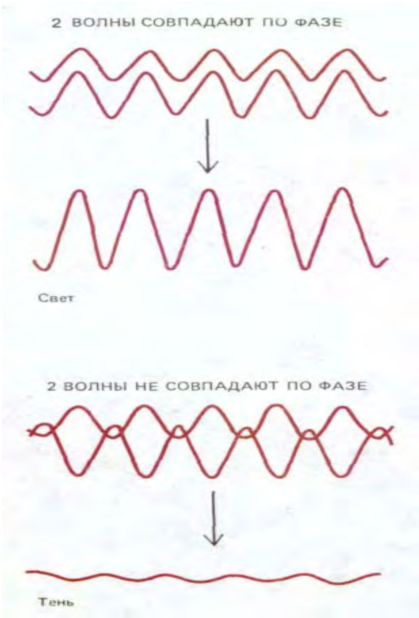


Рис. 4-2. Интерференция световых волн. Если две световые волны совпадают по фазе, амплитуда результирующей волны возрастает и, следовательно, яркость увеличивается. Если две световые волны не совпадают по фазе, они гасят друг друга и образуют волну, амплитуда которой (а следовательно, и яркость) уменьшается.



Рис. 4-3. Эффект интерференции, который можно наблюдать при большом увеличении по краям твердого объекта, расположенного между источником света и наблюдателем.

нения и окраски клеток. И только после того, как они были разработаны, начала проявляться вся сложность клеточной структуры, В основе микроскопии как методологии до сих пор лежат способы приготовления образца и возможности самого микроскопа.

На рис. 4-1 сравниваются степени разрешения в современном световом и электронном микроскопах.

Основные этапы развития современной микроскопии перечислены в табл. 4-1.

4.1.1. С помощью светового микроскопа можно различить объекты, отстоящие друг от друга на 0,2 мкм [2]

В общем случае излучение данной длины волны может быть использовано для изучения только таких структур, минимальные размеры которых еще сопоставимы с длиной волны самого излучения. Этот фундаментальный принцип ограничивает возможности любого микроскопа. Предел разрешения светового микроскопа задается длиной световой волны, которая для видимого света лежит в пределах от 0,4 мкм (фиолетовый) до 0,7 мкм (темно-красный). Из этого следует, что самыми маленькими объектами, которые еще можно наблюдать в световой микроскоп, являются бактерии и митохондрии (их ширина ~ 0,5 мкм). Более мелкие элементы клетки искажаются эффектами, вызванными волновой природой света. Чтобы понять природу этих эффектов, мы должны проследить за тем, что происходит со световыми волнами по мере их прохождения сквозь линзы микроскопа.

Вследствие волновой природы света его луч не движется по идеально прямому пути, предсказываемому законами геометрической оптики. В реальной ситуации световые волны перемещаются сквозь оптическую систему по множеству слегка отличающихся путей. *Оптическая дифракция* обусловлена интерференцией световых волн, пути прохождения которых через оптическую систему несколько различаются. Если световые волны точно совпадают по фазе, т. е. гребень одной соответствует гребню другой, а впадина одной - впадине другой, то они взаимно усиливаются, и яркость возрастает. С другой стороны, если фазы волн не совпадают, они будут взаимно погашаться (рис. 4-2). Тень прямого края, например, освещенного светом одной длины волны, при большом увеличении будет выглядеть как набор параллельных линий, тогда как округлое пятно проявится в виде набора концентрических окружностей (рис. 4-3). По этой же причине отдельная точка выглядит в микроскопе, как яркое пятно, а два ближайших точечных объекта дают перекрывающиеся изображения, которые сливаются в одно. Повышение точности обработки линз не позволяет преодолеть это ограничение, поскольку оно задано волновой природой света.

Предельное разрешение, при котором два объекта могут наблюдаться в отдельности, так называемый предел разрешения - зависит как от волновой природы света, так и от апертуры использованной системы линз (рис. 4-4). В наиболее благоприятных условиях - при фиолетовом свете (длина волны = 0,4 мкм) и апертуре 1,4 можно достигнуть теоретически возможного предела разрешения светового микроскопа около 0,2 мкм. Этот предел был достигнут конструкторами микроскопов в конце XIX столетия (однако в современных микроскопах, производимых серийно, достигается очень редко). И хотя изображение можно увеличить как угодно, например, проецируя его на экран, все же в световой микроскоп нельзя разрешить два объекта, если они разделены расстоянием менее 0,2 мкм: такие объекты будут выглядеть как один объект.

Волновая природа света не всегда является помехой в изучении

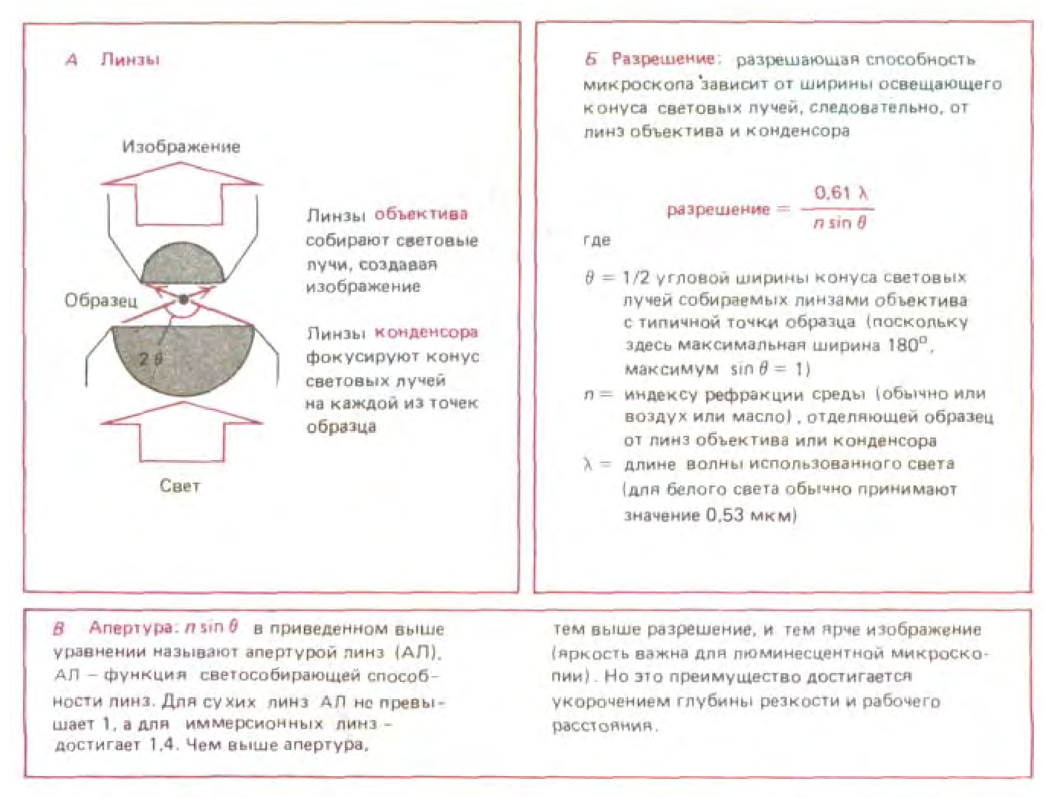


Рис. 4-4. Направление движения световых волн, проходящих сквозь прозрачный образец в микроскопе. Иллюстрирует концепцию апертуры и ее связь с ограничением разрешения.

клеток, позже мы увидим как интерференция и дифракция могут быть использованы для изучения живых неокрашенных клеток. Но сначала необходимо обсудить методы получения постоянных препаратов клеток и то, как с помощью химических красителей можно улучшить возможности наблюдения клеточных структур в таких препаратах.

4.1.2. Для проведения микроскопических исследований ткани обычно фиксируют и режут [2]

Для приготовления постоянного препарата, который можно окрасить и наблюдать в микроскоп, необходимо сначала обработать клетки фиксирующим агентом с тем, чтобы иммобилизировать, убить и сохранить их. Используя химические термины можно сказать, что фиксация повышает доступность клеток красителям; макромолекулы клеток скрепляются поперечными сшивками, что стабилизирует и закрепляет их в определенном положении. Некоторые ранние методы фиксации включали обработку кислотами или органическими растворителями, например, спиртом. В современных методах, как правило, используется обработка альдегидами, например, формальдегидом или глутаральдегидом, которые формируют ковалентные связи со свободными аминогруппами белков и, таким образом, сшивают соседние молекулы.

Толщина большинства образцов тканей слишком велика, чтобы можно было непосредственно изучать отдельные клетки при высоком разрешении. Поэтому после фиксации ткани обычно режут на очень тонкие «ломтики» **(срезы)** на микротоме: это прибор с очень острым металлическим лезвием, который действует подобно хлеборезке (рис. 4-5). Срезы толщиной от 1 до 10 мкм помещают на поверхность предметного стекла. Обычно ткани очень мягки и нежны даже после фиксации и их необходимо перед разделением на срезы **заключать** в поддерживающую среду. Как правило, в качестве заключающих сред используют парафин или специальную смолу. В жидком виде эти среды пропитывают и окружают фиксированную ткань; затем они затвер-

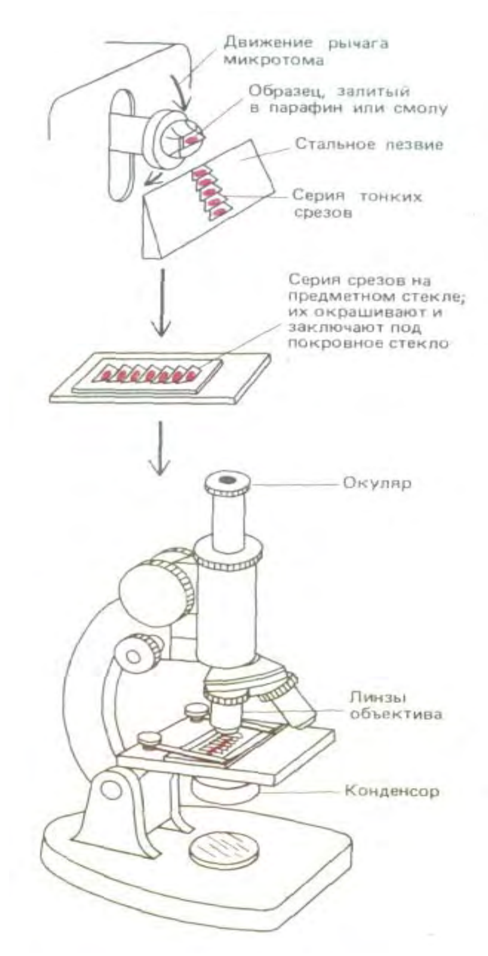


Рис. 4-5. Приготовление среза на микротоме после заливки ткани. Срез предназначен для исследования с помощью светового микроскопа. девают при охлаждении или за счет полимеризации, образуя твердый блок, который удобно резать на микротоме.

Существует серьезная опасность того, что процедуры фиксации или заключения могут повредить структуру клеток или клеточных макромолекул. Вот почему предложен другой метод приготовления срезов, уменьшающий эту опасность, - **быстрое замораживание.** Здесь можно обойтись без фиксации и заливки. Замороженную ткань просто режут на криостате - специальном микротоме, установленном в холодной камере. Полученные таким образом срезы позволяют избежать некоторых артефактов, и в то же время обладают определенными недостатками: отдельные структуры индивидуальных макромолекул, таких, например, как белки, при замораживании сохраняются хорошо, но структура самой клетки может оказаться поврежденной. Следующий этап после приготовления срезов (любым из методов) - их окраска.

4.1.3. Различные компоненты клетки можно окрашивать по-разному [3]

В содержимом большинства клеток, состоящих, как правило, на 70% из воды, практически отсутствуют компоненты, способные помешать прохождению световых лучей. Поэтому в естественном состоянии большинство клеток даже после фиксации и приготовления срезов практически невидимы в обычном световом микроскопе. Одна из возможностей их увидеть состоит в окраске клеток красителями.

В начале XIX столетия ввиду потребности в красителях для текстильной промышленности, органическая химия переживала очень плодотворный период. Оказалось, что некоторые из этих красителей также способны окрашивать биологические ткани. К удивлению исследователей, некоторые из этих красителей обладали определенным сродством к специфическим компонентам клетки - ядру или митохондриям, окрашивая их внутренние структуры и делая их доступными для изучения под микроскопом. В настоящее время известен широкий набор органических красителей. Многие из них обладают весьма колоритными названиями: *малахитовый зеленый, судан черный, кумасси голубой;* каждый краситель характеризуется сродством к определенным субклеточным компонентам. Например, краситель *гематоксилин* имеет сродство к отрицательно заряженным молекулам и поэтому выявляет распределение в клетках ДНК и кислых белков. Химическая природа специфичности многих красителей до сих пор неизвестна.

Накопление опыта в клеточной химии сопровождалось отбором наиболее рациональных и избирательных методов окраски и, в частности, методов, позволяющих отличать специфические белки либо иные макромолекулы клеток. Здесь же возникла проблема чувствительности. Поскольку большинство макромолекул представлены в клетках относительно незначительным числом копий, одна или две молекулы красителя, связанные с макромолекулой, могут оставаться незамеченными. Один из путей разрешения этой проблемы состоял в увеличении числа молекул красителя, ассоциированных с отдельными клеточными молекулами. По каталитической активности в клетках удалось локализовать многие ферменты: при достаточном обеспечении соответствующим субстратом каждая молекула фермента создавала множество молекул видимого продукта реакции. Альтернативный подход к проблеме чувствительности состоит в использовании флуоресценции. В данном случае можно на темном фоне выявлять специфические красители по свету, который они и только они излучают, будучи соответствующим образом возбуждены. Далее мы переходим к объяснению этого феномена.

4.1.4. Специфические молекулы могут быть локализованы в клетках с помощью флуоресцентной микроскопии [4]

Флуоресцирующие красители поглощают свет одной длины волны и излучают свет другой длины волны, более длинной. Если такое вещество облучить светом, длина волны которого совпадает с длиной волны света, поглощаемого красителем, и затем для анализа использовать фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей свету, излучаемому красителем, флуоресцирующую молекулу можно выявить по свечению на темном поле. Высокая интенсивность излучаемого света является характерной особенностью таких молекул. Применение флуоресцирующих красителей для окраски клеток предполагает использование специального **флуоресцентного микроскопа.** Такой микроскоп похож на обычный световой микроскоп, но здесь свет от осветителя, излучаемый мощным источником, проходит через два набора фильтров - один для задержания света перед образцом и другой для фильтрации света, полученного от образца. Первый фильтр выбран таким образом, что он пропускает свет длины волны, возбуждающей определенный флуоресцирующий краситель; в то же время второй фильтр блокирует этот падающий свет и пропускает на окуляр свет длины волны, излучаемой красителем при его флуоресценции (рис. 4-6). Флуоресцентная микроскопия часто используется для выявления специфических белков или других молекул, которые становятся флуоресцирующими после ковалентного связывания с флуоресцирующими красителями. Например, флуоресцирующие красители могут быть связаны с молекулами антител, что сразу же превращает их в высокоспецифические и удобные красящие реагенты, селективно связывающиеся со специфическими макромолекулами на поверхности живой либо внутри фиксированной клетки (см. разд. 4.5.3). Для этой цели обычно используют два красителя - *флуоресцеин,* который дает интенсивную желто-зеленую флуоресценцию после возбуждения светло-голубым светом, и *родамин,* обусловливающий темно-красную флуоресценцию после возбуждения желто-зеленым светом (рис. 4-7). Применяя

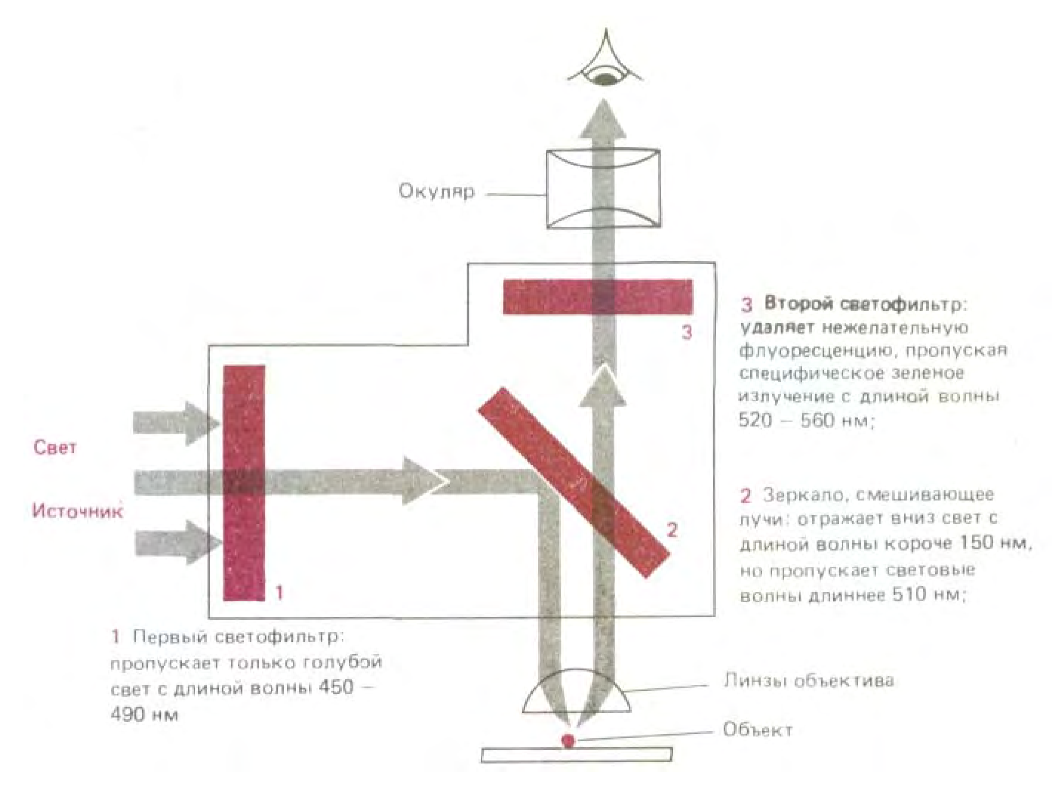


Рис. 4-6. Оптическая система современного флуоресцентного микроскопа состоит из двух избирательных фильтров и дихроического (смешивающего лучи) зеркала. Здесь указан набор фильтров, используемых для выявления свечения флуоресцеина. Для микроскопа этого типа важно наличие в объективе линз, характеризуемых высокой апертурой, так как для данного увеличения яркость изображения пропорциональна одной четвертой апертуры (см. также рис. 4-4).

Флуоресцеин (желто-зеленый)

Тетраметилродамин (красный)

Рис. 4-7. В флуоресцентной микроскопии обычно используют два красителя флуоресцеин и тетраметилродамин, структуры которых представлены на данном рисунке. Флуоресцеин излучает желто-зеленый свет после активации светом соответствующей длины волны. Родамин излучает красный свет. Часть молекулы, обозначенная цветом, указывает на расположение химически активной группы; в этом положении, как правило, формируется ковалентная связь между красителем и белком (или иной молекулой). В настоящее время промышленность выпускает несколько вариантов этих красителей с различными типами реакционно-активных групп, что позволяет «нацелить» этот краситель либо на SH-группы, либо на NH_2-группы белка.

для окраски флуоресцеин и родамин, можно изучать распределение различных молекул, два вида молекул будут выявляться в микроскопе после простого переключения двух наборов фильтров, каждый из которых специфичен для одного из красителей (рис. 4-8).

Далее мы переходим к обсуждению новых важных методов, которые позволяют использовать флуоресцентную микроскопию для анализа изменений концентрации и расположения специфических макромолекул в живых клетках (разд. 4.1.9).

4.1.5. Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы позволяют изучать живые клетки[2]

Возможность потери или нарушения образцов в процессе их приготовления всегда беспокоила микроскопистов. Единственный способ решить эту проблему состоит в изучении живых клеток без фиксации или замораживания. Для этой цели очень полезны микроскопы со специальными оптическими системами.

При прохождении света через живую клетку фаза световой волны меняется согласно коэффициенту рефракции клетки: свет, проходящий через относительно тонкие или относительно толстые участки клетки, такие, как ядро, задерживается, и его фаза соответственно сдвигается по отношению к фазе света, проходящего через относительно тонкие

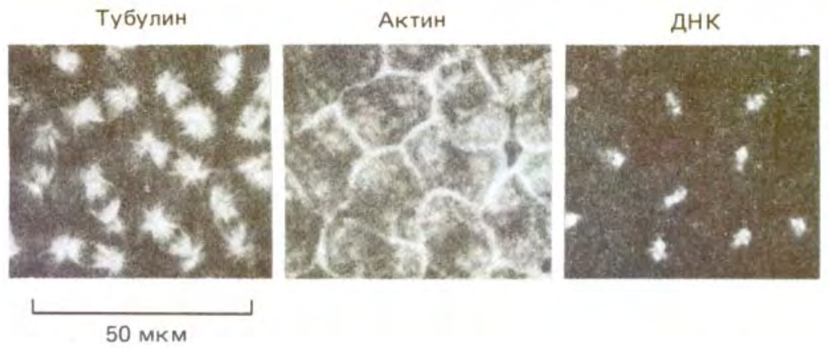


Рис. 4-8. Флуоресцентная микрофотография участка поверхности ранних эмбрионов *Drosophila,* микротрубочки которых были помечены антителами, связанными с флуоресцеином *(слева),* а актиновые филаменты - антителами, меченными родамином (в *центре).* Кроме того, хромосомы были помечены третьим красителем, который флуоресцирует, только связавшись с ДНК *(справа).* На этой стадии все ядра эмбриона расположены в общей цитоплазме и не разделены клеточными стенками; они находятся в метафазе митоза. Все три микроснимка были сделаны с одного участка фиксированного эмбриона с использованием трех различных наборов фильтров в флуоресцентном микроскопе (см. также рис. 4-6). (С любезного разрешения Tim Carr).

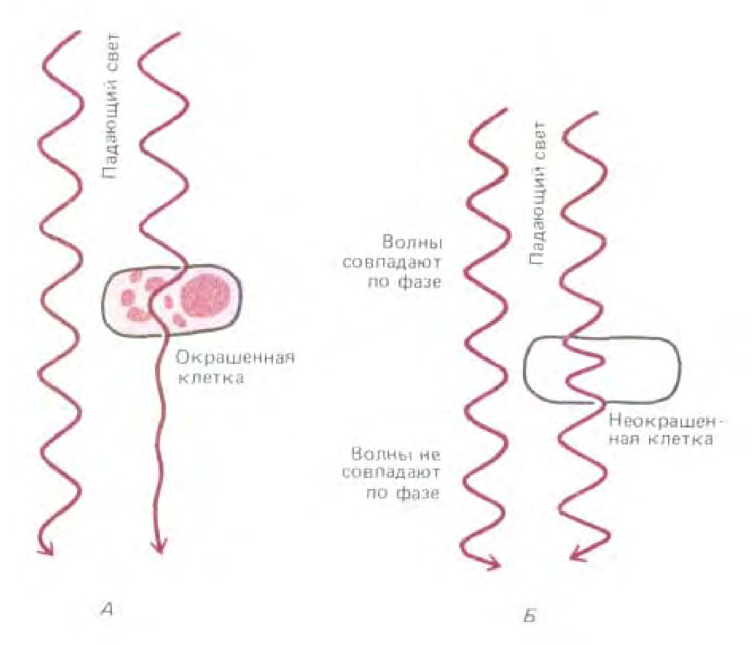


Рис. 4-9. Два способа увеличения контраста в световой микроскопии. *А.* Окрашенные участки клетки уменьшают амплитуду проходящих световых волн определенной длины. В результате можно получить окрашенное изображение, видимое при прямом наблюдении. *Б.* Амплитуда световых волн, проходящих через неокрашенную живую клетку, практически не меняется; поэтому многие детали нельзя увидеть при прямом наблюдении. Здесь, однако, имеет место изменение фазы проходящего света явление, используемое в фазово-контрастном и интерференционном микроскопах для получения высококонтрастного изображения.

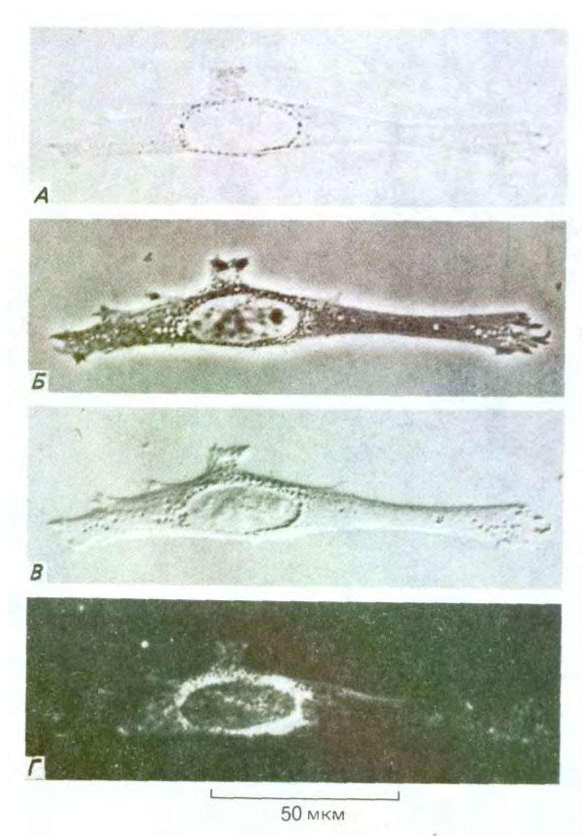


Рис. 4-10. Фибробласт в культуре ткани при наблюдении с помощью четырех различных типов световой микроскопии. *А.* Изображение получено при прямом прохождении лучей через клетку (микроскопия в светлом поле). Остальные изображения получены с помощью методов, рассматриваемых в тексте: Б-фазово-контрастная микроскопия; *В* -интерференционная микроскопия; *Г* микроскопия в темном поле. Простая замена компонентов оптики большинства современных микроскопов позволяет получать все четыре типа изображения.

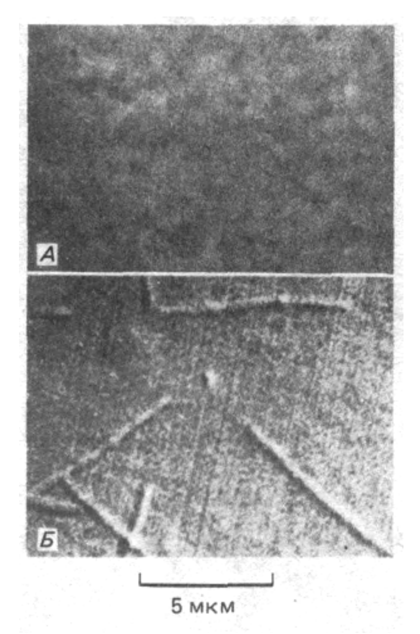


Рис. 4-11. Изображение неокрашенных микротрубочек, наблюдаемое в интерференционном микроскопе. *А.* Исходное необработанное изображение; *Б.* Изображение, полученное после электронной обработки, существенно увеличивающей контраст и снижающей «шум». Хотя диаметр микротрубочек всего 0,025 мкм, вследствие дифракции они выглядят, как значительно более толстые филаменты. (С любезного разрешения Bruce Sohnapp.)

участки цитоплазмы. Как в **фазово-контрастном, так и в интерференционном микроскопе** используются эффекты интерференции, возникающие при рекомбинации двух наборов волн, которые и создают изображение клеточных структур (рис. 4-9). Оба типа световой микроскопии широко используются для наблюдения живых клеток.

Простейший способ разглядеть детали клеточной структуры - наблюдать свет, рассеивающийся различными компонентами клетки. **В темнопольном микроскопе** лучи от осветителя направляются сбоку и при этом в линзы микроскопа попадают только рассеянные лучи. Соответственно клетка выглядит как освещенный объект на темном поле. Изображение одной и той же клетки, полученное четырьмя способами световой микроскопии, показано на рис. 4-10.

Одним из основных преимуществ фазово-контрастной, интерференционной и темнопольной микроскопии является возможность наблюдать движение клеток в процессе митоза и миграции. Клеточные движения, как правило, совершаются очень медленно и их сложно наблюдать в реальном времени. В этом случае используют *покадровую* (цейтраферную) *микрокиносъемку* или видеозапись. Последовательные кадры при этом разделены во времени, но при воспроизведении записи с нормальной скоростью картина реальных событий ускоряется.

4.1.6. Изображение можно усиливать или анализировать с помощью электронных методов [5]

В последние годы видеокамеры и соответствующие технологии обработки изображения значительно увеличили возможности световой микроскопии. Благодаря их применению удалось не только преодолеть трудности, связанные с несовершенством оптической системы, но и решить проблемы, обусловленные особенностями физиологии человека. Они состоят в том, что:

1) глаз не регистрирует очень слабый свет;

2) глаз не способен фиксировать небольшие отличия в интенсивности света на ярком фоне.

Первая из этих проблем была преодолена после присоединения к микроскопу сверхвысокочувствительных видеокамер (подобных тем, которые используются при ночных съемках). Это позволило наблюдать клетки в течение длительного времени при низкой освещенности, исключая длительное воздействие яркого света (или тепла). Системы усиления изображения особенно важны для изучения в живых клетках флуоресцирующих молекул.

Поскольку изображение создается видеокамерой в форме электронных сигналов, его можно соответствующим образом преобразовать в числовые сигналы, направить в компьютер и затем подвергнуть дополнительной обработке для извлечения скрытой информации. Эти и подобные методы обработки изображения позволяют компенсировать оптические недостатки микроскопов и практически достичь предела разрешения. Более того, используя современные видеосистемы, контраст может быть усилен настолько, что преодолеваются ограничения глаза в детектировании небольших отклонений интенсивности света. Хотя этот процесс усиливает случайные отклонения фона в оптической системе, такой «шум» может быть устранен специальными методами. Таким образом, благодаря современным подходам мы получили возможность анализировать прозрачные объекты, ранее не отличимые от фона.

Высокий контраст, достижимый с помощью компьютерной интерференционной микроскопии, позволяет наблюдать даже очень мелкие объекты, как, например, отдельные микротрубочки (рис. 4-11), диаметр

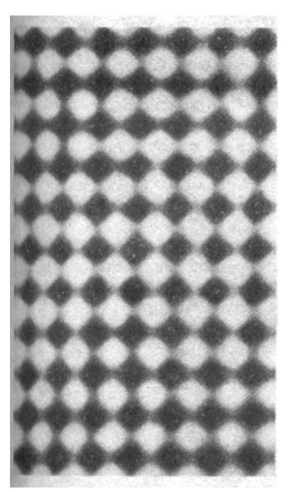


Рис. 4-12. Электронная микроскопия тонкого слоя золота позволяет выявить отдельные атомы в виде отдельных ярких пятен. Расстояние между соседними атомами золота около 0,2 нм. (С любезного разрешения Graham Hills.)

которых менее одной десятой длины волны света (0,025 мкм). Отдельные микротрубочки можно увидеть и с помощью флуоресцентной микроскопии (см. рис. 4-56). Однако в обоих случаях неизбежны эффекты дифракции, сильно изменяющие изображение. Диаметр микротрубочек при этом завышается (0,2 мкм), что не позволяет отличать отдельные микротрубочки от пучка из нескольких микротрубочек. Для решения этой задачи необходим электронный микроскоп, предел разрешения которого сдвинут далеко за пределы длины волны видимого света.

4.1.7. Электронный микроскоп позволяет анализировать тонкую структуру клетки [6]

Взаимосвязь длины волны света и предела разрешения (см. рис. 4-4) сохраняется для любой формы излучения, как для световых лучей, так и для электронов. Однако в последнем случае предел разрешения существенно ниже. Длина волны электрона уменьшается с увеличением его скорости. В электронном микроскопе с напряжением 100000 В длина волны электрона равна 0,004 нм, а согласно теории, разрешение такого микроскопа составляет 0,002 нм. Однако коррекция аберрации электронных линз - задача более сложная, чем для стеклянных линз, и поэтому в реальности разрешение современных электронных микроскопов в лучшем случае 0,1 нм (1 А) (рис. 4-12). Более того, трудности приготовления образца, его повреждение излучением существенно снижают нормальное разрешение, которое для биологических объектов составляет 2 нм (20 А) (т.е. примерно в 100 раз выше, чем у светового микроскопа).

Некоторые из достижений в развитии электронной микроскопии перечислены в табл. 4-2.

Общая схема **просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ)** напоминает схему светового, хотя электронный микроскоп значительно больше и как бы перевернут (рис. 4-13). Источник излучения - нить катода, испускающая электроны с вершины цилиндрической колонны высотой около двух метров. Поскольку при столкновении с молекулами воздуха электроны рассеиваются, в колонне должен быть создан вакуум. Электроны, излучаемые катодной нитью, ускоряются ближайшим анодом и проникают через крошечное отверстие, формируя электронный луч, проходящий в нижнюю часть колонны. Вдоль колонны на некотором расстоянии расположены кольцевые магниты, фокусирующие электронный луч, подобно стеклянным линзам, фокусирующим луч света в световом микроскопе. Образец через воздушный шлюз помещают в вакуум колонны, на пути электронного пучка. Часть электронов в момент прохождения через образец рассеивается согласно плотности вещества в данном участке, остаток электронов фокусируется и образует изображение (подобно формированию изображения в световом микроскопе) на фотопластинке или на фосфоресцирующем экране.

4.1.8. Для наблюдения под электронным микроскопом биологические образцы необходимо подвергнуть специальной обработке [7]

Применение электронного микроскопа в биологии позволило увидеть в клетках множество удивительных структур. Но прежде, чем эти открытия были сделаны, ученым пришлось изрядно потрудиться, чтобы разработать новые методы заключения тканей, их резки и окрашивания.

<u>**Таблица 4-2**. Основные вехи в истории электронной микроскопии</u>

1897 - **Томсон** (J. J. Thomson) сообщил о существовании отрицательно заряженных частиц, названных позже электронами

1924 - **Де Бройль** (de Broglie) предположил, что движущийся электрон обладает волновыми свойствами

1926 - **Буш** (Busch) доказал, что с помощью цилиндрических магнитных линз можно сфокусировать электронный луч. Так были заложены основы электронной оптики

1931 - **Руска** (Ruska) и соавторы создали первый просвечивающий электронный микроскоп

1935 - **Кнолль** (Knoll) показал возможность создания сканирующего электронного микроскопа; спустя три года фон Ардене (Von Ardene) сконструировал его прототип

1939 – **Сименс** (Siemens) создал первый просвечивающий электронный микроскоп, который нашел широкое применение.

1944 - **Уильяме** и **Виков** (Williams, Wyckoff) разработали метод оттенения металлом

1945 - **Портер, Клод и Фуллам** (Porter, Claude, Fullam) использовали электронный микроскоп для изучения клеток в культурах тканей после их фиксации и окраски

1948 - **Пиз и Бейкер** (Pease, Baker) представили убедительные доказательства, что ими получены тонкие срезы биологического материала (толщиной 0,1-0,2 мкм)

1952 - **Паладе, Портер и Шестранд** (Palade, Porter, Sjostrand) разработали методы фиксации и приготовления тонких срезов. Это позволило впервые увидеть многие внутриклеточные структуры. **Хаксли** (Н. **E.** Xuxley) был одним из первых, кто применил эти методы, и ему удалось показать, что скелетная мышца содержит перекрывающиеся сети белковых филаментов. Так были получены доказательства в пользу гипотезы «скользящих нитей», объясняющей сокращение мышцы

1953 - **Портер и Блюм** (Porter, Blum) разработали ультрамикротом, который первым нашел широкое применение. В нем были использованы многие принципы, предложенные ранее **Клодом и Шестрандом** (Claude, Sjostrand)

1956 - **Глауэрт** (Glauert) и сотрудники показали, что смола аралдит является высокоэффективным средством для заключения препаратов в электронной микроскопии. Пятью годами позже Люфт (Luft) предложил другую смолу для заключения - эпон

1957 - **Робертсон** (Robertson) первым наблюдал в электронный микроскоп и описал трехслойное строение клеточной мембраны

1957 - Метод «замораживание-скалывание», разработанный **Стиром** (Steere), был усовершенствован **Муром и Мюреталером** (Moor, Muhlethaler). Позже (в 1966 г.), **Брентон** (Branton) показал, что данный метод позволяет изучать внутреннее строение мембран

1959 - **Бреннер и Хорн** (Bretftier, Home) усовершенствовали метод негативного контрастирования, который был разработан **Холлом** (Hall) четырьмя годами ранее, после чего этот метод вошел в широкую практику

1959 - **Сингер** (Singer) использовал антитела, связанные с ферритином, для выявления молекул клетки с помощью электронной микроскопии

1963 - **Сабатини, Бенш и Баррнетт** (Sabatini, Bensch, Barrnett) начали использовать глутаральдегид (с последующей обработкой OsO4) в качестве фиксатора для электронной микроскопии

1965 - Фирма «Кембридж Инструменте» (Cambridge Instruments) впервые выпустила для продажи сканирующий электронный микроскоп

1968 - **Де Розьер и Клуг** (de Rosier, Klug) описали метод определения трехмерных структур по электронным микрофотографиям

1975 - **Хендерсон и Унвин** (Henderson, Unwin) впервые определили тонкое строение мембранного белка, используя реконструкцию электронных микрофотографий неокрашенных белков на компьютере

1979 - **Хейзер, Рис** (Heuser, Reese) и сотрудники разработали высокоразрешающий метод глубокого травления, основанный на сверхбыстром замораживании

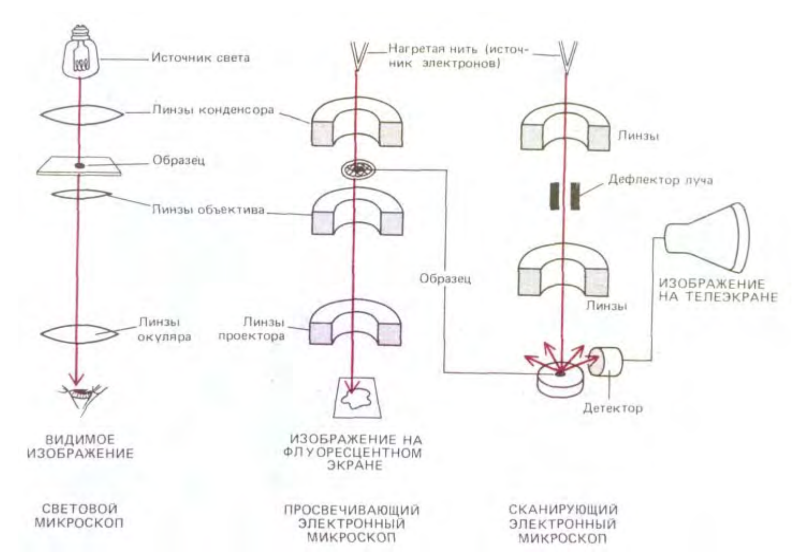


Рис. 4-13. Схематическое изображение основных узлов светового микроскопа, а также просвечивающего и сканирующего электронных микроскопов, подчеркивающее сходные черты в конструкции этих приборов. В электронных микроскопах обоих типов образец должен быть помещен в вакуум.



Рис. 4-14. Глутаральдегид и тетраоксид осмия наиболее распространенные фиксаторы, используемые в электронной микроскопии. Две реакционноспособные альдегидные группы глутаральдегида позволяют сшивать различные типы молекул с помощью ковалентных связей, вытесняющих атомы водорода (выделены цветом). Тетраоксид . осмия восстанавливает многие органические соединения, с которыми образует поперечно-сшитые комплексы. Это свойство особенно ценно в случае клеточных мембран, поскольку тетраоксид осмия реагирует с двойными связями С -С, характерными для многих жирных кислот.

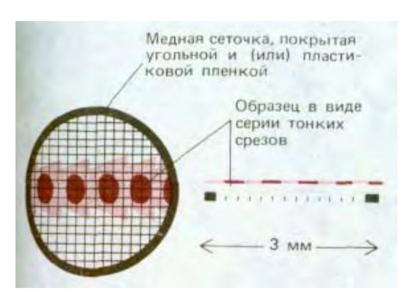


Рис. 4-15. Схематическое изображение медной сеточки, используемой для поддержания тонких срезов образца в просвечивающем электронном микроскопе.

В электронном микроскопе все образцы подвергаются действию вакуума высокой степени разрежения и поэтому их невозможно наблюдать в живом влажном состоянии. Ткани обычно сохраняют с помощью фиксации - сначала *глутаральдегидом,* ковалентно связывающим белковые молекулы между собой, а затем *осмиевой кислотой,* связывающей и стабилизирующей двойной слой липидов и белки (рис. 4-14). Электроны обладают низкой проникающей способностью, этим вызвана необходимость получения срезов толщиной от 50 до 100 нм (1/200 толщины одной клетки). Только такие срезы можно наблюдать в электронный микроскоп. Для этого потребовалось также предварительное обезвоживание образца и пропитка мономерными смолами, которые после полимеризации создают твердый блок пластмассы, заключающий образец; блок затем режут с помощью тонкого стеклянного или алмазного ножа на специальном микротоме. Полученные срезы не содержат воды или иных летучих органических веществ; такие срезы помещают на небольшую круглую металлическую сетку для наблюдения под микроскопом (рис. 4-15).

Контраст, создаваемый в электронном микроскопе, определяется атомным числом веществ образца. Чем выше атомное число, тем больше электронов рассеивается и тем выше контраст. В состав биологических молекул входят атомы с очень низким атомным числом (в основном кислород, водород, углерод и азот). Для усиления контраста образцы до и после резки импрегнируют солями тяжелых металлов, таких, как осмий, уран и свинец. Компоненты клетки выявляются с разной степенью контраста согласно степени их импрегнации (или окраски) этими солями. Как правило, липиды окрашиваются осмием в темный цвет и это позволяет выявлять мембраны (рис. 4-16).

С помощью методов электронной микроскопии в некоторых случаях на тонких срезах удается локализовать специфические макромолекулы. Некоторые ферменты клеток выявляются после инкубации образцов с субстратами, ферментативная реакция с которыми приводит к местному отложению электроноплотного осадка (рис. 4-17). Кроме того, для локализации специфических макромолекул можно использовать

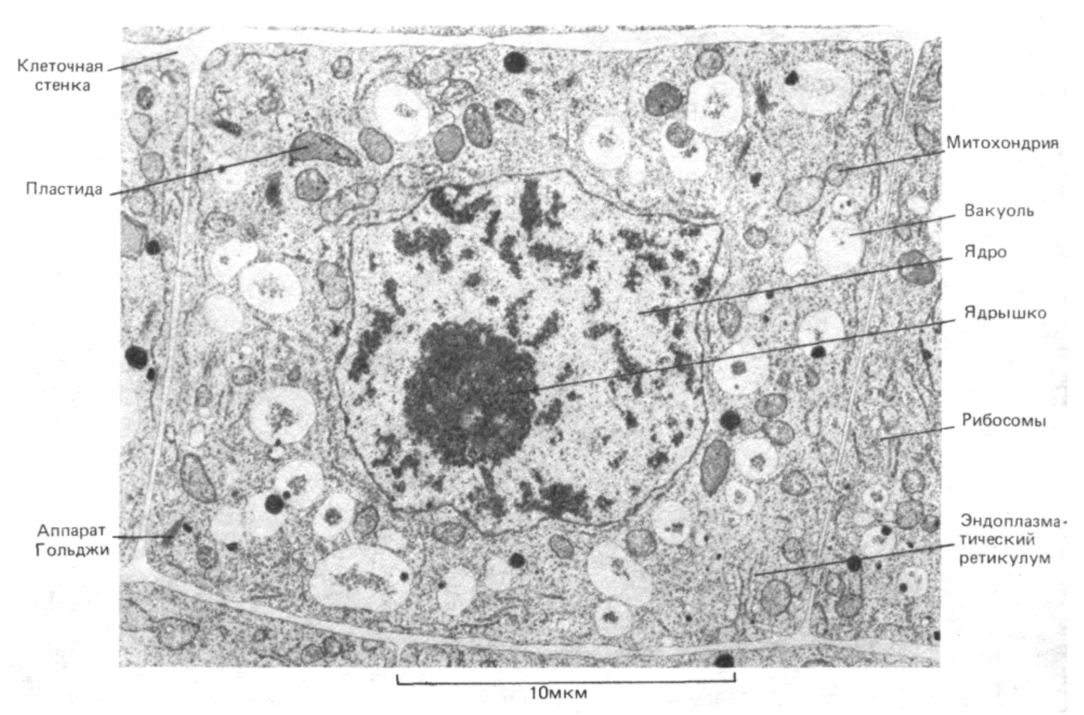


Рис. 4-16. Тонкий срез верхушки корня злака. Легко различимы клеточная стенка, ядро, вакуоли, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и рибосомы. (С любезного разрешения Brian Gunning.)

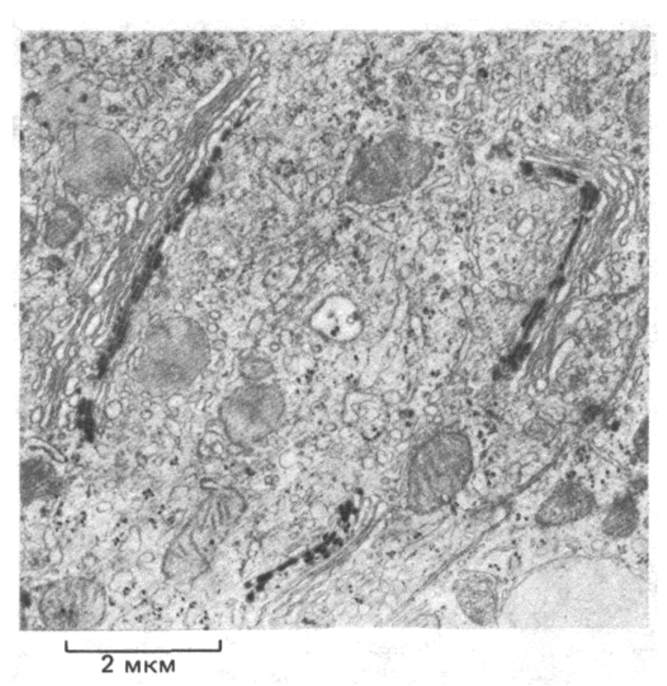


Рис. 4-17. Электронная микрофотография клетки, иллюстрирующая локализацию конкретного фермента (нуклеотиддифосфатазы) в аппарате Гольджи. Тонкий срез клетки инкубирован с субстратом, образующим под действием фермента электроноплотный осадок. (С любезного разрешения Daniel Friend.)

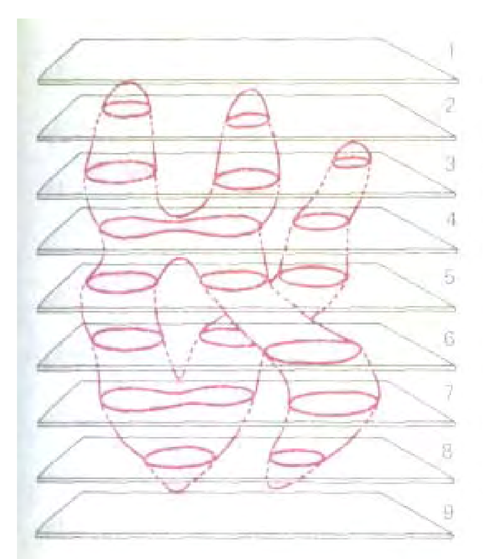


Рис. 4-18. Схематическое изображение, иллюстрирующее, как легко прийти к ошибочным выводам, изучая отдельные тонкие срезы. Так, например, в данном случае рассматриваются срезы клетки, в которой имеется лишь одна разветвленная митохондрия. Между тем создастся впечатление, что большинство срезов содержит две или три отдельные митохондрии. Более того, может показаться, что на срезах 4 и 7 выявляемая митохондрия находится в процессе деления. Серийные срезы позволяют реконструировать реальную форму, существующую в действительности.

меченые антитела, если их связать с индикаторным ферментом пероксидазой или электроноплотным маркером, например, частицами *коллоидного золота* (см. разд. 4.5.3).

4.1.9. Сканирующий электронный микроскоп используется для получения трехмерного изображения поверхности [8]

Тонкие срезы практически являются двумерными срезами ткани и не позволяют судить о трехмерной структуре клеточных компонентов. Трехмерное изображение можно получить после реконструкции сотен серийных срезов (рис. 4-18), но это долгий и утомительный процесс. В настоящее время разработаны более прямые методы получения трехмерного изображения. Один из них состоит в изучении образца под сканирующим электронным микроскопом (СЭМ), который обычно меньше и проще, чем просвечивающий электронный микроскоп. Для получения изображения в просвечивающем электронном микроскопе используют электроны, проходящие через образец, а в сканирующем электронном микроскопе используются электроны, рассеиваемые или излучаемые поверхностью образца. В данном случае образец должен быть зафиксирован, высушен и покрыт тонкой пленкой тяжелого металла. Затем образец сканируется очень узким пучком электронов. При этом оценивают количество электронов, рассеиваемых при облучении последовательных точек металлической поверхности. Полученное значение используют для контроля интенсивности второго луча, движущегося синхронно первому и формирующему изображение на телевизионном экране. Таким образом происходит формирование единого, цельного и значительно увеличенного изображения.



Рис. 4-19. Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа микрофотография стереоцилий, расположенных *в* виде органных труб на поверхности волосковых клеток внутреннего уха. (С любезного разрешения R. Jackobs, A.J. Hudspeth.)

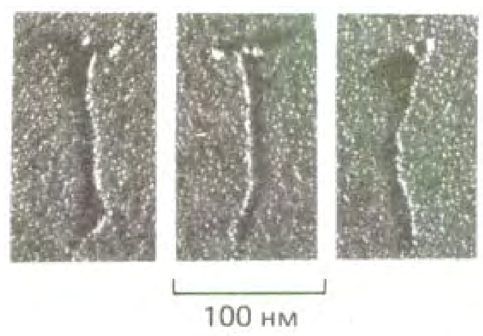


Рис. 4-20. Электронная микрофотография отдельных молекул белка миозина (оттенение платиной). Миозин основной компонент сократительного аппарата мышц; здесь можно увидеть, что он состоит из двух глобулярных участков, связанных с общим палочковидным хвостом. (С любезного разрешения Arthur Elliot.)

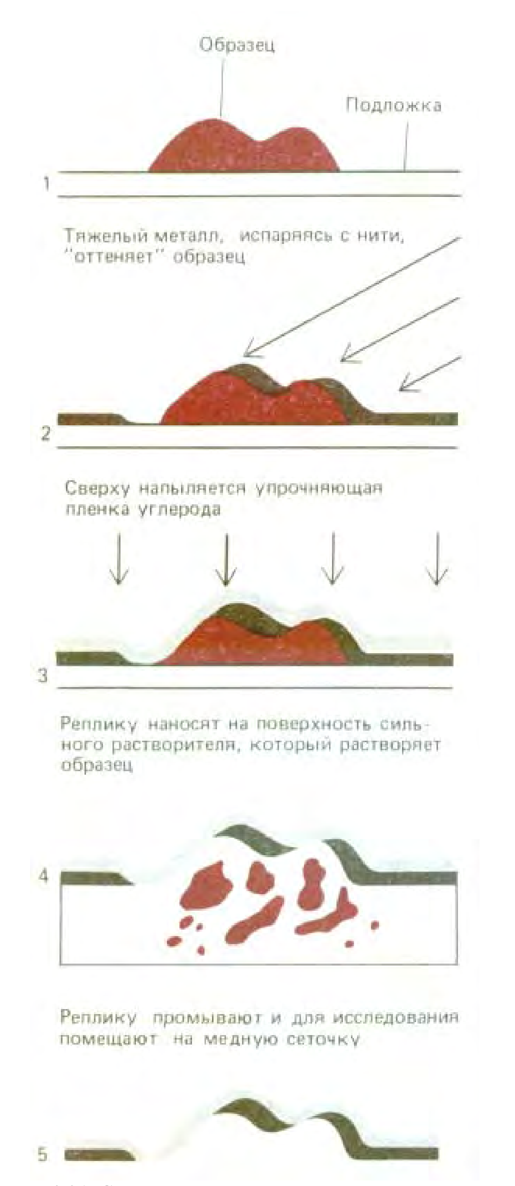


Рис. 4-21. Схематически показан метод приготовления реплики с поверхности образца (оттенение металлом). Обратите внимание, что толщина слоя металла определяется контуром поверхности исходного образца.

Метод сканирующей электронной микроскопии обеспечивает значительную глубину фокусировки; более того, поскольку масштабы рассеивания электронов определяются углом поверхности по отношению к лучу, на изображении возникают чередующиеся светлые и темные участки, создающие впечатление трехмерности (рис. 4-19). Но этот метод применим только для изучения поверхности и его разрешение сравнительно невелико (около 10 нм с эффективным увеличением примерно 20 тыс. раз). Данный метод практически неприменим для изучения субклеточных органелл и используется исключительно для изучения целых клеток и тканей.

Используя обычные тонкие срезы, поворачивая их и фотографируя их под разными углами, можно и в обычном просвечивающем электронном микроскопе получить имитацию трехмерного изображения. При наблюдении в стереоочки полученной стереопары изображений объекта возникает псевдотрехмерное изображение. Толщина образцов, изучаемых этим методом, определяется проникающей способностью электронов или их энергией. Совершенствование метода привело к созданию высоковольтных микроскопов с ускоряющим напряжением до 1 млн. вольт (против 100 тыс. вольт у обычных ПЭМ). Эти гигантские приборы позволяют изучать по методу просвечивающей электронной микроскопии срезы толщиной в несколько микрометров.

4.1.10. Для изучения деталей поверхности в просвечивающем электронном микроскопе используют оттенение [9]

Просвечивающий электронный микроскоп можно использовать для изучения поверхности образца с очень большим увеличением, наблюдая отдельные макромолекулы. Как и при сканирующей электронной микроскопии, на высушенный образец напыляется тонкая пленка тяжелого металла, например, платина. Металл напыляется под определенным углом, так что отложения напыленной пленки в некоторых местах толще, чем в других. Этот процесс известен как оттенение здесь возникает эффект тени, создающий впечатление трехмерности изображения.

Приготовленные таким образом образцы могут быть достаточно малы и тонки, чтобы электронный луч проникал сквозь них; например, таким способом можно анализировать индивидуальные молекулы. вирусы и стенки клеток (рис. 4-20). Что же касается более толстых образцов, то здесь после оттенения необходимо удалить органический материал клетки, при этом на поверхности образца останется только . тонкий металлический отпечаток или реплика поверхности. Эта реплика затем усиливается углеродной пленкой, после чего ее можно поместить на сетку и изучать в обычном электронном микроскопе (рис. 4-21).|

4.1.11. Методы электронной микроскопии замораживание-скалывание и замораживание травление обеспечивают уникальную возможность наблюдать внутреннее строение клетки [10]

В клеточной биологии особенно успешно используются два метода, основанные на получении механических реплик. Один из них - метод электронной микроскопии «замораживание-скалывание» - дает возможность изучать внутреннее строение клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота (-196°С) в присутствии *криопротектора* (антифриза) во избежание искажений за счет образования кристаллов льда. Замороженный блок затем раскалывают



Рис. 4-22. Электронная микрофотография тилакоидной мембраны хлоропластов клетки растений, полученная по методу замораживания-скалывания. Тилакоидные мембраны, осуществляющие фотосинтез, уложены в виде множества слоев. Плоскость скола переходит с одного слоя на другой и проходит через середину каждого липидного бислоя. Внутримембранные белки, которые содержатся в значительном количестве внутри двойного слоя, обнажаются и после натенения выявляются в виде внутримембранных частиц в этой платиновой реплике. Самой крупной частицей, выявляемой на мембране, является комплекс из множества белков, образующих фотосистему II. (С любезного разрешения L. F. Staehelin.)

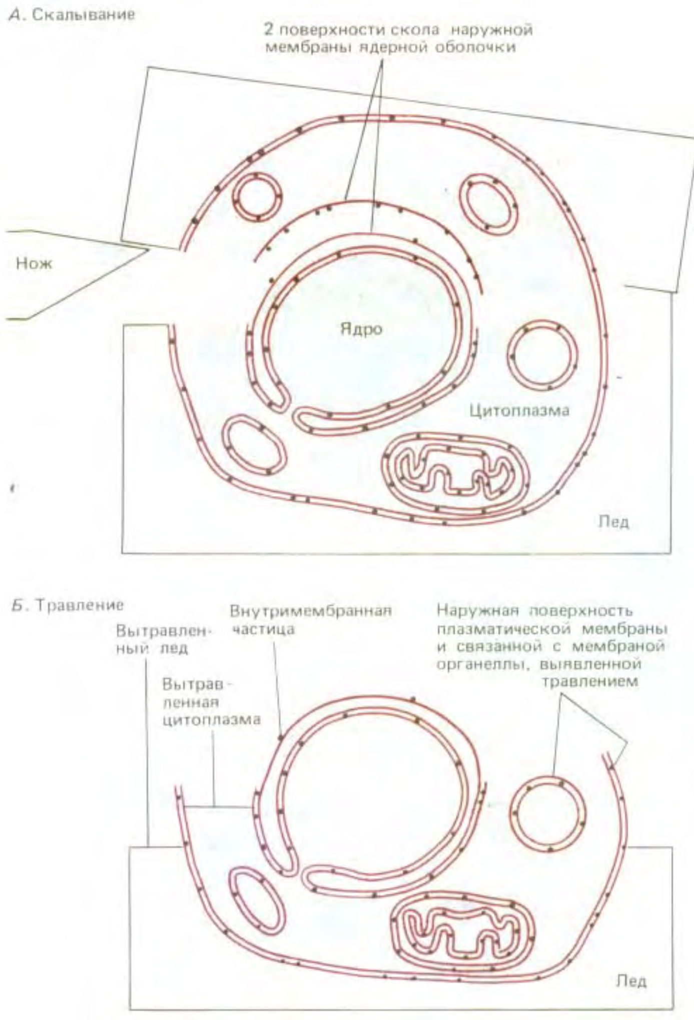


Рис. 4-23. Электронная микроскопия по методу замораживания-травления. Замороженный образец раскалывают ножом *(А)*. Затем, сублимируя воду под вакуумом, уменьшают слой льда и обнажают таим образом поверхность клетки (Б). После этого готовят реплику все еще замороженной поверхности (как описано в подписях к рис. 4-21) и проводят исследование с помощью просвечивающего электронного микроскопа.

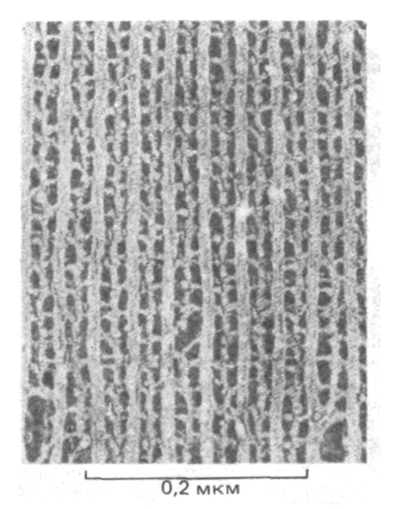


Рис. 4-24. Регулярно уложенные белковые филаменты в мышце насекомых. Для получения этого изображения мышечные клетки были заморожены в жидком гелии, расколоты через цитоплазму и подвергнуты глубокому высушиванию. Затем была приготовлена металлическая реплика, которую изучали при большом увеличении. (С любезного разрешения Roger Cooke, John Heuser).

лезвием ножа. Скол часто проходит через гидрофобную середину двойного слоя липидов, обнажая внутреннюю поверхность клеточных мембран. Образующуюся поверхность скола оттеняют платиной, органический материал удаляют и изучают полученные реплики в электронном микроскопе (рис. 4-21). Такие реплики усеяны небольшими *выпячиваниями - внутримембранными частицами,* которые представляют собой крупные мембранные белки. Этот метод чрезвычайно удобен и эффективен при анализе распределения таких белков на поверхности мембраны (рис. 4-22).

Другой важный метод электронной микроскопии - метод «замораживания-травления» - используется для изучения внешней поверхности клеток и мембран. В данном случае клетки замораживают при очень низкой температуре и замороженный блок раскалывают лезвием ножа. Содержание льда вокруг клеток (и в меньшей степени внутри клеток) понижают возгонкой воды в вакууме при повышении температуры (процесс называют *вакуумной сушкой)* (рис. 4-23). Участки клетки, подвергнутые такому травлению, затем оттеняют (как было показано ранее) для приготовления платиновой реплики.

Метод замораживания - травления не позволяет использовать криппротекторы, поскольку они не летучи и по мере возгонки воды остаются в образце. Чтобы добиться высокого качества изображения, необходимо препятствовать образованию больших кристаллов льда. Это возможно при *ускоренном замораживании* образца (при скорости замораживания выше 20° С в миллисекунду). Один из методов такого быстрого замораживания состоит в использовании специального устройства. быстро сближающего образец с медным блоком, охлажденным до — 269°С жидким гелием. Особенно впечатляющие результаты получают после глубокого травления быстро замороженных клеток. Этот метод позволяет выявлять структуры внутреннего содержимого клеток, демонстрируя их трехмерную организацию с исключительной четкостью (рис. 4-24).

Поскольку в этом случае в микроскопе под вакуумом наблюдают не образцы, а реплики, полученные после оттенения металлом, методы замораживание - скалывание и замораживание - травление можно использовать для изучения замороженных нефиксированных клеток и исключить риск проявления артефактов, вызванных фиксацией.

4.1.12. Методы негативного контрастирования и криоэлектронной микроскопии обеспечивают высокое разрешение при анализе макромолекул

Используя для контрастирования оттенение солями тяжелых металлов, можно наблюдать в электронный микроскоп изолированные макромолекулы, например, ДНК или большие белки (см. рис. 4-20), а после **негативного контрастирования** разрешению поддаются даже мельчайшие детали. При приготовлении образцов для негативного контрастирования исследуемые молекулы наносят на тонкую пленку углерода (практически прозрачную для электронов), затем ее смачивают концентрированным раствором солей тяжелых металлов, например, уранилацетата. После высушивания образца тонкая пленка солей тяжелых металлов равномерно покрывает углеродную подложку, за исключением участков, занятых адсорбированными макромолекулами. Вещество макромолекул более проницаемо для электронов по сравнению с прилежащими участками, покрытыми солями тяжелых металлов; за счет этого возникает обращенное или негативное изображение молекулы. Негативное окрашивание используется особенно эффективно для наблюдения больших агрегатов макромолекул (вирусы, рибосомы) либо

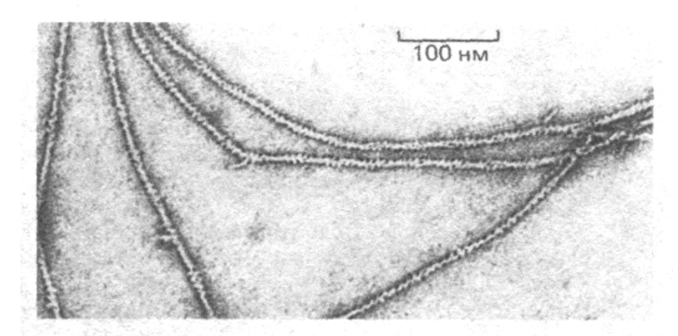


Рис. 4-25. Электронные микрофотографии негативно окрашенных актиновых нитей. Диаметр каждой из этих нитей составляет примерно 8 нм. При тщательном исследовании видно, что актиновые нити состоят из двух спирально закрученных цепей глобулярных молекул актина. (С любезного разрешения Roger Craig.)

для наблюдения субъединичной структуры белковых филаментов (рис. 4-25).

Методы негативного контрастирования и оттенения обеспечивают высококонтрастное изображение поверхности небольших скоплений макромолекул, но разрешение этих методов ограничено размерами металлических частиц, образующих тень, либо молекул красителей, состоящих из солей тяжелых металлов, которые лишь грубо очерчивают поверхность молекулы или макромолекулярного ансамбля. Однако в настоящее время можно наблюдать с высоким разрешением даже внутренние детали трехмерных структур, таких, как вирусы. Для этого используют метод **криоэлектронной микроскопии,** где очень тонкий (примерно, 100 нм) быстро замороженный слой влажного образца помещают на микроскопическую решетку. С помощью специального приспособления гидратированный образец удерживают при — 160°С в вакууме микроскопа. Таким способом можно наблюдать материал практически непосредственно: без фиксации, окраски и сушки. Гомогенность витрифицированного водного слоя и использование недофокусированного фазового контраста позволяют получать удивительно четкие изображения таких неокрашенных образцов (рис. 4-26).

Вне зависимости от использованных методов отдельные белковые молекулы дают в электронном микроскопе слабые и плохо различимые изображения. Попытки извлечь информацию за счет удлинения времени наблюдения или повышения интенсивности освещающего луча тщетны, поскольку при этом имеет место разрушение наблюдаемого объекта. Для анализа деталей молекулярной структуры необходимо объединять информацию о многих молекулах, чтобы избежать случайных ошибок,

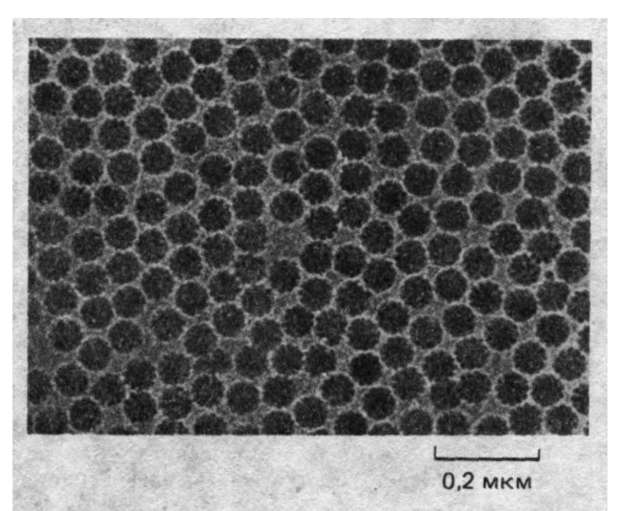


Рис. 4-26. Вирус леса Семлики в тонком слое неокрашенной вирифицированной воды (криоэлектронная микроскопия при — 160°С.) С помощью электронной обработки микрофотографий можно получить трехмерное изображение с высоким разрешением. (С любезного разрешения Jacques Duboshet; см. также S.D. Fuller, Cell, 48, 923-934, 1987.)

исходящих от индивидуальных изображений. Такой подход приемлем для изучения вирусов или белковых филаментов, отдельные субчастицы которых представлены в виде регулярно повторяющихся элементов; он пригоден также для изучения любых веществ, которые могут быть расположены в двумерной кристаллической решетке, где значительное число молекул сохраняют одинаковую ориентацию или разделены одинаковыми промежутками. Используя электронные микрофотографии структур, ориентированных подобным образом, можно применить методы обработки изображения и высчитать среднее изображение отдельных молекул, выявив детали, приглушенные случайным «шумом» исходного снимка.

Реконструкции изображения по этому методу позволяют получить детальную структуру оболочки вируса с разрешением в 3,5 нм, а детали формы индивидуальных макромолекул можно исследовать с разрешением 0,5 нм (5 А). Но даже наиболее изощренные методы электронной микроскопии не дают возможность полностью описать молекулярную структуру, поскольку атомы в молекулах разделены расстоянием около 0,1-0,2 нм. Для изучения молекулярной структуры макромолекул на атомарном уровне необходимы иные методы - методы. в которых вместо электронов используются рентгеновские лучи.

4.1.13. Детальная структура молекул, образующих кристаллическую решетку, может быть рассчитана на основании полученных дифракционных картин [12]

Рентгеновские лучи, подобно свету, являются одной из форм электромагнитного излучения, но вследствие того, что длина волны рентгеновских лучей значительно короче, их применение позволяет разрешить значительно более мелкие детали. Однако в отличие от видимого света или потока электронов, рентгеновские лучи нельзя сфокусировать и после их прохождения через образец получить обычное изображение. Однако структуру образца можно выявить, используя метод **дифракции рентгеновских лучей.**

Сперва рассмотрим одиночный объект (например, отдельную молекулу), расположенный на пути любого излучения, длина волны которого меньше размеров объекта. Объект будет рассеивать часть излучения. Рассеянное излучение можно рассматривать как набор перекрывающихся волн, каждая из которых отражается разными участками объекта. Если волны перекрываются, они подвергаются интерференции и возникает распределение излучения, известное как **дифракционная картина.** Дифракционная картина может быть зарегистрирована на фотопластинке, помещенной на некотором расстоянии от предмета, или представлена с помощью количества рассеянного излучения, отраженного объектом в разных направлениях (рис. 4-27). Форма дифракционной картины определяется структурой объекта. С другой стороны, исходя из полного описания дифракционной картины, можно теоретически рассчитать структуру данного объекта. Опыт показывает, что дифракционная картина для отдельной молекулы чересчур слаба и недостоверна, и потому ее нельзя использовать в качестве отправной точки для теоретического анализа.

Предположим, что множество идентичных объектов расположено в кристаллической решетке и на них направлен пучок каких-то лучей (рис. 4-28). В этом случае общее количество рассеянного излучения значительно выше. Однако излучение, рассеянное одной молекулой, будет интерферировать с излучением, рассеянным другими молекулами. В некоторых направлениях индивидуальные рассеянные лучи будут усиливаться, образуя на дифракционной картине яркое пятно. Полная

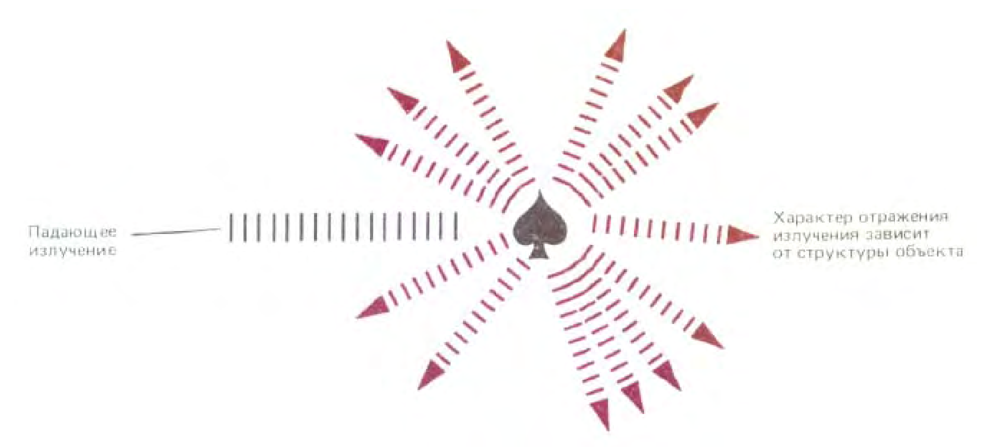


Рис. 4-27. Рассеивание излучения одиночным объектом, размеры которою соизмеримы с длиной волны излучения. Излучение, падающее на объект, рассеивается в разных направлениях и с разной интенсивностью. Интенсивность излучения, рассеиваемого в данном направлении, зависит от интерференции излучения, рассеиваемого различными участками объекта. О результирующей интенсивности рассеивания во всех возможных направлениях можно судить по числу окрашенных лучей на диаграмме.



Рис. 4-29. Часть рентгенограммы кристалла белка. Именно этот кристалл был использован для определения расположения атомов в молекуле протеолитического фермента трипсина. (С любезного разрешения Robert Stroud.)

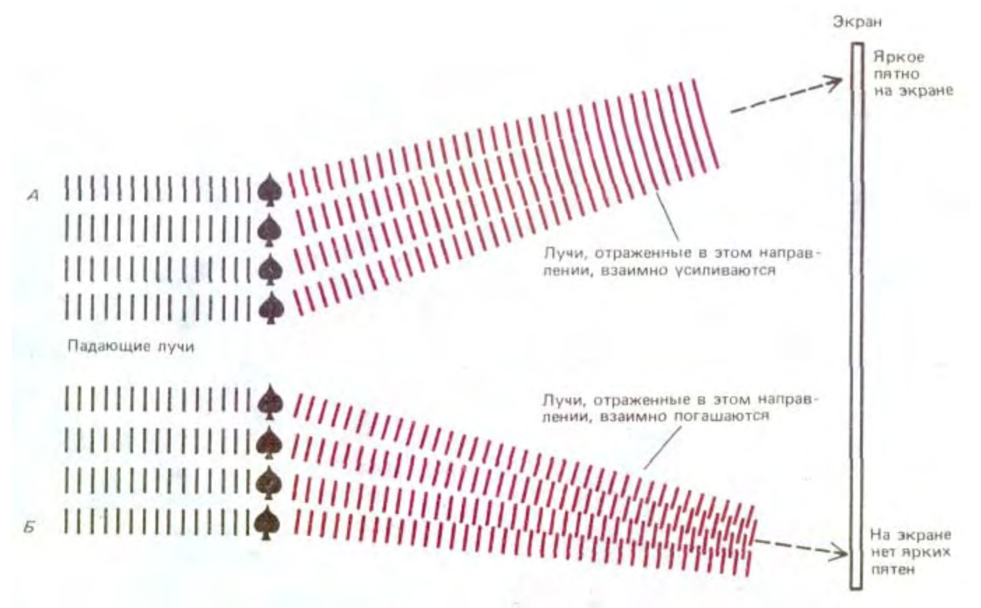


Рис. 4-28. Рассеивание излучения кристаллом. Если многие идентичные объекты расположены в виде кристаллической решетки, излучение, рассеиваемое каждым объектом, интерферирует с излучением, рассеиваемым другими объектами. Отдельные отраженные лучи рассеиваются только в определенных направлениях (в зависимости от пространственного расположения объекта в решетке), образуя яркие пятна. Интенсивность данного яркого пятна зависит от интенсивности, с которой каждый объект в решетке мог бы рассеивать излучение в данном направлении, если бы его исследовали в отдельности, как это показано на рис. 4-27.

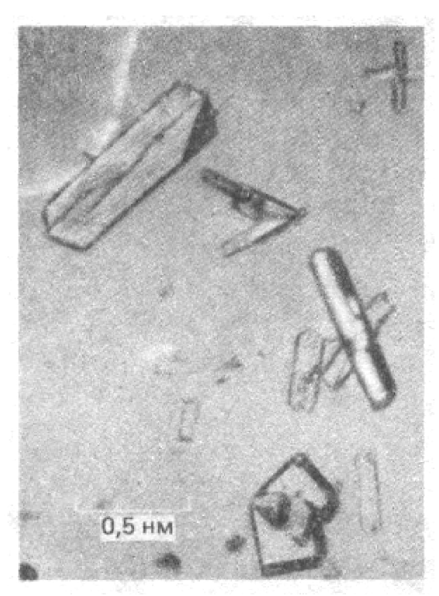


Рис. 4-30. Кристаллы фермента гликоген-фосфорилазы при наблюдении в световой микроскоп. (С любезного разрешения Robert Fletterick.)

дифракционная картина кристаллической решетки будет состоять из множества ярких пятен различной интенсивности (рис. 4-29). Относительная интенсивность различных пятен в дифракционной картине зависит от способности различных объектов в решетке рассеивать излучение. В действительности интенсивность данного пятна пропорциональна интенсивности излучения, которое будет отражаться в данном направлении от характерного одиночного объекта. Таким образом, *положение* пятен в дифракционной картине зависит от расположения объекта в системе, а их *интенсивность* дает информацию о внутренней структуре типичного объекта. Более того, такая информация является точной и достаточной, поскольку она была получена путем объединения вкладов множества равноценных источников. На самом деле, пользуясь довольно полным описанием дифракционной картины такой решетки, можно зачастую вычислить структуру отдельных объектов, образующих кристаллическую решетку.

4.1.14. Дифракция рентгеновских лучей дает возможность выявить трехмерную организацию атомов в молекулах [13]

Если для анализа молекулярной структуры предполагается использовать дифракционные картины, то излучение, претерпевающее дифракцию, должно иметь длину волны более короткую, чем расстояние между атомами в молекуле. Длина волны рентгеновских лучей около 0,1 нм (что соответствует диаметру атома водорода), и поэтому данный тип излучения идеально подходит для анализа расположения индивидуальных атомов в молекулах. Такую задачу нельзя решить даже на самых современных электронных микроскопах. Существенным преимуществом рентгеновских лучей является высокая (выше, чем у электронов) проникающая способность. Это делает пригодными для анализа более толстые образцы. И наконец, поскольку в данном случае использование вакуума не предусмотрено, можно изучать толстые водосодержащие образцы. Вследствие этого исключаются артефакты, возникающие в процессе приготовления образца.

Для достижения высокого разрешения необходимо иметь кристаллы с высокой степенью упорядоченности (рис. 4-30). По мере прохождения через образец рентгеновские лучи рассеиваются электронами атомов, составляющими образец. Поэтому большие атомы с большим количеством электронов рассеивают рентгеновские лучи более эффективно, чем небольшие атомы, так что атомы С, N, О, Р регистрируются гораздо более надежно, чем атомы Н; известно, что очень тяжелые атомы тоже рассеивают рентгеновские лучи очень эффективно. Процесс преобразования рентгенограммы в трехмерную структуру атомов, уложенных в молекулу, весьма сложен. Расшифровка рентгенограмм, образованных крупными и неупорядоченными молекулами белков, до 1960 года была невозможна (табл. 4-3). Эта процедура требует локализации и оценки интенсивности сотен тысяч пятен, равно как и фаз волн каждого пятна. В последние годы рентгеноструктурный анализ все более автоматизируется. Рассеянные рентгеновские лучи измеряются изощренными электронными детекторами, что существенно ускоряет процесс накопления данных, а мощные компьютеры выполняют множество необходимых вычислений. В настоящее время наиболее длительным этапом в подобном исследовании является этап получения подходящих кристаллов исследуемых макромолекул; зачастую на подбор оптимальных условий кристаллизации уходят годы. Но, несмотря на эти трудности, рентгеноструктурный анализ нашел широкое применение, поскольку до настоящего времени остается единственным

Таблица 4-3. Основные вехи в развитии метода рентгеноструктурного анализа и его применение в исследовании биологических молекул

1864 - **Хоппе-Зейлер** (Hoppe-Seyler) получил в кристаллическом виде гемоглобин и предложил для него название.

1895 - **Рентген** (Roentgen) наблюдал образование новой формы проникающей радиации при попадании катодных лучей (потока электронов) на металлическую мишень. Это излучение было названо Рентгеном Х-лучами (в русской научной литературе «рентгеновские лучи»)

1912 - **фон Лауэ** (Von Laue) получил первую рентгенограмму, пропуская рентгеновские лучи через кристалл сульфида цинка

1912 - **В. Л. Брэгг и В. Х. Брэгг** (W. L. Bragg, W. H. Bragg) обнаружили простую взаимосвязь между характером дифракционной картины и расположением атомов в кристалле

1926 - **Самнер** (Sumner) получил кристаллы уреазы из экстрактов канавалии мечевидной й показал, что эти белки обладают каталитической активностью

1931 - **Полинг** (Pauling) опубликовал свою работу «Природа химических связей», в которой уточнил правила ковалентного связывания

1934 - **Бернал и Кроуфут** (Bernall, Crowfoot) представили первую подробную рентгенограмму белка, полученную для кристаллов фермента пепсина

1935 - **Паттерсон** (Patterson) разработал аналитический метод определения расстояния между атомами по данным рентгеноструктурного анализа

1941 - **Эстбюри** (Astbury) получил первую рентгенограмму ДНК

1951 - **Полинг** и **Кори** (Pauling, Corey) обосновали существование двух основных типов укладки цепи L-аминокислот (в виде α-спирали и складчатого β-слоя), которые были позже обнаружены во многих белках

1953 - **Уотсон и Крик** (Watson, Crick) предложили модель двойной спирали ДНК на основе рентгенограмм, полученных Франклин и Уилкинсом (Franklin, Wilkins)

1954 - **Перутц** (Perutz) и сотрудники разработали метод тяжелых атомов для решения проблемы фазы в кристаллографии белка

1960 - **Кендрью** (Kendrew) впервые подробно описал структуру белка (миоглобина кашалота) с разрешением 0,2 нм, а Перутц (Perutz) - структуру более крупного белка - гемоглобина, но в этом случае разрешение было несколько хуже

1966 - **Филлипс** (Phillips) впервые подробно описал структуру белка лизоцима

1976 - **Ким, Рич, Клуг** (Kim, Rich, Clugh) и сотрудники, использовав данные рентгеноструктурного анализа, подробно описали структуру тРНК

1977-78 - **Холмс и Клуг** (Holmes, Clugh) определили структуру вируса табачной мозаики (ВТМ), а Гаррисон и Россман (Harrison, Rossman)- структуру двух сферических вирусов

методом определения детального расположения атомов в большинстве молекул. Имея хорошие кристаллы, можно рассчитать структуру белка с разрешением 0,3 нм и выявить не только основные закономерности расположения полипептидной цепи, но и некоторые более мелкие детали. Затратив значительные усилия, можно получить кристаллы высокого качества, что в свою очередь позволяет достичь разрешения 0,15 нм и определить расположение почти всех неводородных атомов в молекуле белка. Именно таким образом к настоящему времени были установлены структуры более сотни белков и нескольких малых молекул РНК и ДНК.

Заключение

Для наблюдения клеток существует множество методов световой микроскопии. Окрашенные и фиксированные клетки можно наблюдать с помощью обычной оптики. Использование флуоресцентного микроскопа

и меченых антител позволяет локализовать в клетках специфические молекулы. Клетки в естественном живом состоянии анализируют под фазово-контрастной, интерференционной или темнопольной оптикой. Светомикроскопические исследования живых клеток подкрепляются обработкой изображений с помощью электроники, что существенно усиливает чувствительности и увеличивает разрешение.

Определение подробной структуры мембран и органелл в клетках возможно только при высоком разрешении, которое дает просвечивающий электронный микроскоп. Просвечивающий электронный микроскоп также используют для определения формы индивидуальных макромолекул, оттененных тяжелыми металлами или негативным контрастированием. Однако точное расположение каждого атома в молекуле можно определить только после образования молекулами крупных кристаллов. В этом случае с помощью рентгеноструктурного анализа может быть рассчитана полная трехмерная структура молекулы.

4.2. Изучение химической среды в живых клетках

Классические методы микроскопии позволяют судить о клеточной архитектуре, но не дают подробной информации о клеточной химии. Мы уже говорили о том, что для локализации в клетках специфических макромолекул можно использовать антитела. Но столь же важно знать распределение и концентрацию малых молекул. Поддержание жизни возможно только при быстрой и точной регуляции концентрации таких важнейших метаболитов, как АТР, глюкоза и неорганические ионы; содержание этих веществ в различных участках клеток и тканей может существенно варьировать. Более того, поскольку низкомолекулярные вещества, такие, как клеточный АТР, кальций и водород могут выполнять функцию внутриклеточных «мессенджеров», очень важно уметь прослеживать изменение их концентрации в ответ на внутриклеточные сигналы. В этом разделе мы будем обсуждать некоторые методы, заимствованные из химии, методы, которые позволяют определять химические условия в клетках в процессе их жизнедеятельности.

4.2.1. Для определения химических условий в популяции живых клеток можно использовать ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [14]

Ядра многих атомов характеризуются магнитным моментом: следовательно, они, подобно магнитным стрелкам, обладают внутренним магнетизмом. Магнитные характеристики этих атомов подвержены влиянию со стороны окружающих атомов. Метод **ядерного магнитного резонанса (ЯМР),** являющийся безвредным для живых клеток, позволяет определить химическую природу вещества. Если ядра атомов, обладающие магнитным моментом, поместить в магнитное поле, они принимают одну из возможных ориентации. Каждая из ориентации характеризуется энергией, определяемой силой поля и химическим окружением. При облучении радиоволнами набора атомов в идентичном химическом окружении, энергия этих волн будет в значительной степени абсорбироваться, если волны обладают строго определенной частотой, соответствующей разности энергетических состояний двух возможных ориентации ядер в магнитном поле. Это так называемая *резонансная частота.* Образец ткани содержит атомы в различных молекулах и в различном окружении и будет поглощать энергию на различных резонансных частотах. Диаграмма поглощения на резонансных частотах для данного образца составит его *спектр ЯМР.* Такой

спектр отражает структуру и относительное содержание каждого типа молекул, содержащих магнитные ядра.

В химических лабораториях ЯМР широко используется как аналитическая методика для определения структуры малых молекул в растворах. Совершенствование приборного парка сделало возможным применение метода ЯМР для изучения биологических объектов. Например, сигнал ЯМР, исходящий от протонов (ядер водорода), часто используется для изучения белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул в растворе: взаимодействие частей макромолекулы влияет на спектр ЯМР, и поэтому спектр ЯМР содержит подробную информацию о молекулярной структуре и молекулярных движениях. В отличие от рентгеноскопии ЯМР не требует кристаллизации образцов. Однако для создания содержательного спектра ЯМР молекулы в растворах должны быстро «кувыркаться». Этим и объясняется существование верхнего предела (около 20 тыс. дальтон), ограничивающего размеры макромолекул, конформация которых может подвергаться эффективному анализу.

Лишь некоторые атомы имеют изотопы, создающие удовлетворительный сигнал ЯМР. Для изучения макромолекул, содержащихся внутри живой клетки, обычно используют широко распространенные

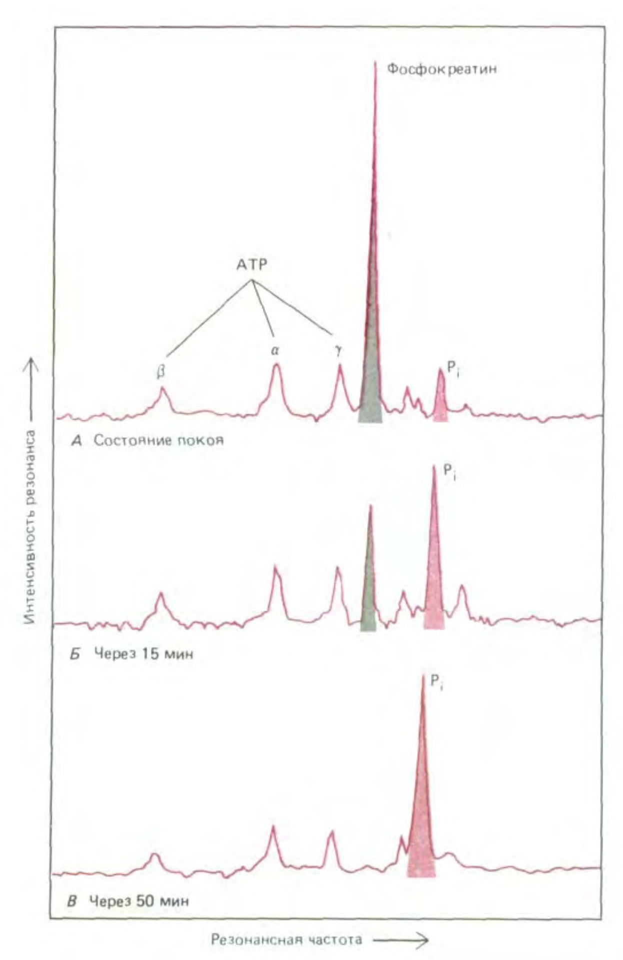


Рис. 4-31. Спектр ЯМР ^{31}P, записанный с мышцы лягушки *(А -в* расслабленном состоянии, *Б* после 15 мин стимулируемой активности в анаэробных условиях, *В* после 50 мин такой активности). Пять меченых пиков на спектре представляют сигналы от ядер Р, находящихся в различных атомах: один пик соответствует фосфокреатину, α, β и γ -трем фосфатным группам АТР и PI - неорганическому фосфату. В расслабленной мышце фосфокреатин содержится в высокой концентрации *(А);* он выполняет функцию депо свободной энергии в скелетных мышцах, поскольку его фосфат прямо переносится на ADP для восстановления АТР, гидролизуемого в процессе мышечного сокращения. Следовательно, в уставшей мышце депо фосфокреатина снижается, а концентрация неорганического фосфата (образующегося из АТР) соответственно возрастает. Пик Pi также слегка смещается влево, отражая изменение клеточного pH за счет накопления молочной кислоты - побочного продукта анаэробного метаболизма. По расположению пика Pi, сравниваемого с таковым для известного стандарта, можно рассчитать, что в данном случае pH изменился от 7,5 *(А)* до 6,4 *(В)*. (Изменено с разрешения M.J. Dowson, D. J. Gedian, D.R. Wilkie, Nature, 274, 861-866, 1978. Copyright 1978 McMillan Magazine Ltd.)

изотопы ^{1}H, ^{23}Na, ^{31}P, ^{39}K и редкие изотопы $^{13}Cu^{15}N$. Ввиду важной роли соединений фосфора, которую они играют в метаболизме, эффективным оказывается определение ЯМР ^{13}P. Этот изотоп в норме присутствует в фосфорсодержащих веществах клеток. Сигналы, создаваемые им, можно использовать для слежения за изменением внутриклеточной концентрации в процессе мышечного сокращения таких соединений, как АТР и неорганический фосфат. Сигналы ЯМР от изотопа фосфора ^{31}P полезны также для точного измерения внутриклеточного pH, поскольку резонансная частота неорганического фосфата определяется состоянием его ионизации и, следовательно, pH раствора (рис. 4-31).

Редкие изотопы ^{13}C и ^{15}N в норме не содержатся в клетках в достаточных количествах, однако их можно вводить в специфические макромолекулы, имеющие биологическое значение. С помощью ЯМР удается следить впоследствии за их химической трансформацией. Если, например, выращивать клетки на среде с глюкозой ^{13}C, то, измеряя в течение некоторого времени спектр ЯМР образца, можно определять скорость многих реакций, в которых участвует глюкоза. Используя другие меченные ^{13}C и ^{15}N соединения, можно в принципе следить за перемещением атомов углерода и азота по любым метаболическим путям.

Основным ограничением метода ЯМР является его низкая чувствительность. Например, для определения содержания какого-либо соединения с использованием современных модификаций метода ^{31}P-ЯМР, в грамме живой ткани должно содержаться не менее 0,2 мМ исследуемого соединения. Однако многие метаболиты присутствуют в живых тканях в более низких концентрациях. Более того, поскольку для снятия одного спектра ЯМР требуется, как правило, несколько минут, можно не уловить быстрые изменения цитохимических характеристик. С другой стороны, значительное преимущество ЯМР состоит в его безвредности для живых клеток, и это обстоятельство делает данный метод весьма перспективным для клеточной биологии.

4.2.2. Концентрацию ионов можно измерять внутриклеточными электродами [15]

Для изучения отдельных клеток необходимо использовать методы более чувствительные, чем ЯМР. Один из них основан на подходе, разработанном электрофизиологами для изучения разности потенциалов и тока на плазматической мембране. С этой целью готовят внутриклеточные *микроэлектроды*. Они состоят из тонких стеклянных трубок, диаметр конца которых измеряется долями микрона; такие трубочки заполняют электропроводным раствором (обычно это раствор соли KC1 в воде). Кончик микроэлектрода вводят в цитоплазму через плазматическую мембрану, которая смыкается вокруг капилляра, плотно прилегая к стеклу, так что клетка остается относительно неповрежденной.

В исследовании клеточного содержимого микроэлектроды используют двояко: с их помощью можно измерять внутриклеточную концентрацию обычных ионов, таких, как ионы H^+, Na^+, K^+, $C1^-$, Ca^{2+} и Mg^{2+} . Они могут быть использованы и для инъекции молекул в клетки. Принцип измерения концентрации ионов микроэлектродом тот же, что и в pH-метре. Стремление ионов диффундировать по градиенту концентрации может быть уравновешено приложением электрического поля противоположной направленности: чем выше градиент концентрации, тем выше значение электрического поля. Величина электри-

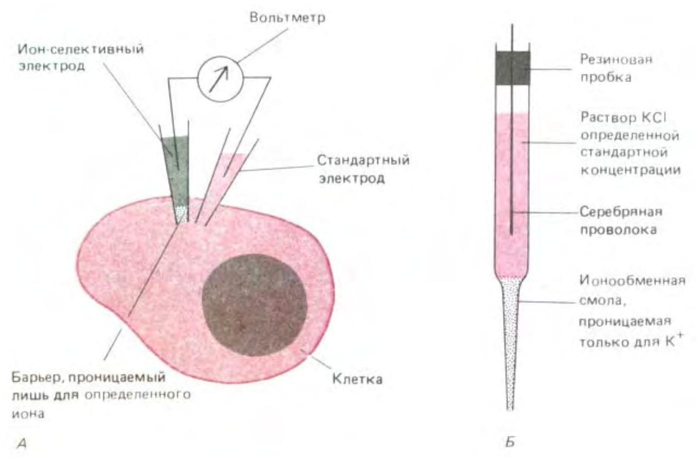


Рис. 4-32. Для измерения внутриклеточной концентрации ионов можно использовать ион-селективный электрод. *А*. Схема эксперимента. *Б*. Конструкция микроэлектрода, избирательного для K^+ . Обычно кончик ион-селективного внутриклеточного электрода выполнен из специального стекла либо заполнен особым органическим соединением, проницаемым для определенных ионов. Остальная часть трубки заполнена водным раствором ионов данной концентрации и содержит металлический проводник, присоединенный к одной из клемм вольтметра. Подобным образом другая клемма соединена со стеклянным стандартным микроэлектродом с открытым кончиком, содержащим обычный электропроводящий раствор. Оба электрода вводят сквозь плазматическую мембрану в исследуемую клетку. Напряжение на вольтметре соответствует разнице потенциалов на селективном барьере и отражает содержание ионов в клетке (см. текст). Обычно крупные клетки прокалывать микроэлектродом проще; при диаметре клетки менее 10 мкм применение данного метода усложняется.

ческого поля, необходимого для удержания градиента концентрации в стабильном состоянии, позволяет судить о величине градиента концентрации ионов. Для определения концентрации специфического иона необходимо создать преграду из материала, проницаемого только для данного иона, и поместить эту преграду между раствором известной концентрации и тем раствором, в котором измеряется содержание данного иона. Разность потенциалов на селективно проницаемом барьере в условиях отсутствия электрического поля может использоваться как мера соотношения концентрации определенного иона по обе стороны барьера (см. разд. 6.4.15). На практике кончик микроэлектрода заполняют соответствующим органическим соединением, создавая барьер, селективно проницаемый для определенного иона. Данный микроэлектрод и стандартный микроэлектрод затем вводят внутрь клетки, как показано на рис. 4-32.

В последнее время микроэлектродную технику стали использовать для изучения транспорта ионов через специализированные белковые каналы (именуемые также ионными каналами), содержащиеся в небольших участках плазматической мембраны. В этом случае необходим стеклянный микроэлектрод с несколько более толстым кончиком. Его не вводят в плазматическую мембрану, а плотно и мягко прижимают к ней (рис. 4-33). Это позволяет регистрировать электрические характеристики небольшого участка мембраны, прилегающего к кончику микроэлектрода, который прикасается к клетке или находится на небольшом расстоянии от нее (рис. 4-34). Данный метод известен как **«пэтч-регистрация»** (регистрация в данном участке). Его применение произвело настоящую революцию в исследовании ионных каналов. Это единственный метод клеточной биологии, который дает возможность изучать функцию одиночной белковой молекулы в реальном времени; мы вернемся к рассмотрению данного вопроса в гл. 6.

4.2.3. Быстрые изменения концентрации внутриклеточных ионов можно измерять с помощью светоизлучающих индикаторов [16]

Электроды, чувствительные к определенным ионам, позволяют измерять их концентрацию только в одной точке на клеточной поверхности. Если же ионы представлены в клетках в низкой концентрации, например



Рис. 4-33. Микропипетки, используемые для «пэтч»-регистрации. Показано, как клетка - палочка из глаза саламандры - удерживается присасывающей пипеткой, а стеклянная пипетка с тонким кончиком прижата к клетке; стекло плотно соприкасается с плазматической мембраной и выполняет функцию микроэлектрода. (Из T. D. Lamb, H.R. Mattews, V. Torre, J. Physiol, 37, 315-349, 1986.)

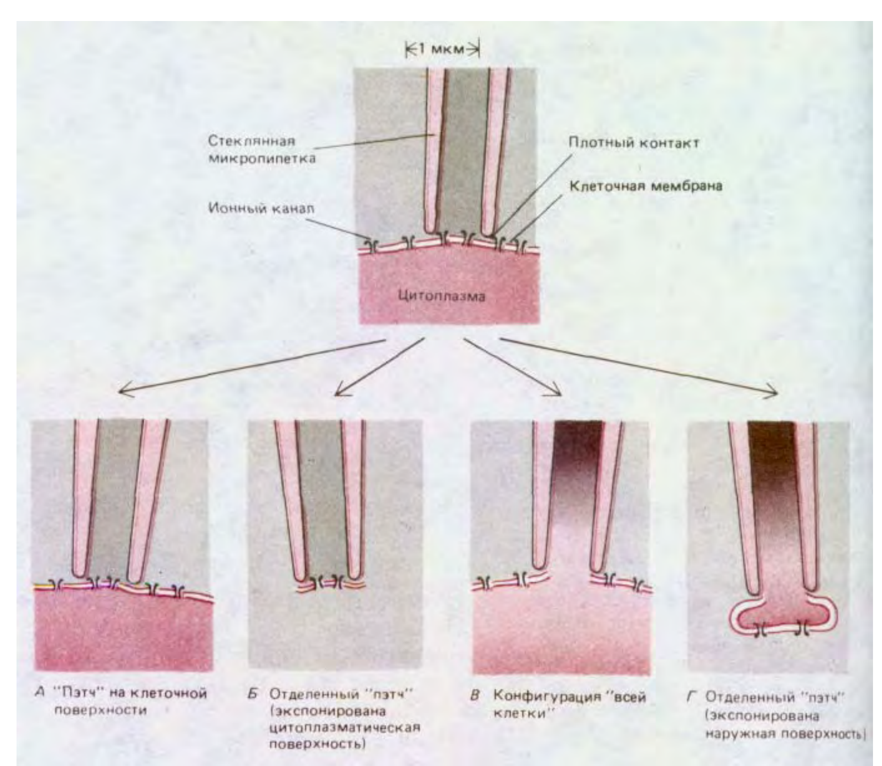


Рис. 4-34. Четыре стандартных варианта «пэтч»-регистрации. Отверстие стеклянной регистрирующей пипетки сперва прижимают к клеточной мембране, создавая плотный контакт *(вверху).* Величину тока проходящего через пипетку в данном участке мембраны можно определить, если участок мембраны сохраняет контакт с клеткой *(А);* участок мембраны отделен от клетки и цитоплазматическая поверхность этого участка обнажена (6); мембрана разрушена при мягком всасывании и электрод напрямую сообщается с внутренним содержимым клетки. Вариант, представленный в правой части рисунка *(Г),* позволяет регистрировать электрические характеристики клетки, как при использовании внутриклеточного электрода. В данном случае можно изменить химические условия в клетке за счет введения определенных веществ, диффундирующих в цитоплазму через сравнительно толстую регистрирующую пипетку. Конфигурация *Г* возникает из конфигурации 5, когда пипетка отделяется от клетки и соприкасающийся с электродом участок мембраны как бы затыкает пипетку. В случае *Г* с электродом, как правило, соприкасается не цитоплазматическая, а наружная поверхность мембраны (сравните с *Б).*

ионы Ca^{2+} , показания таких электродов зачастую оказываются ошибочными. Между тем изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} очень важно учитывать при изучении реакции клеток на внеклеточные сигналы. Такие изменения можно анализировать, используя внутриклеточные индикаторы, излучающие свет. Некоторые из этих индикаторов по своей природе являются люминесцентными (излучающими свет спонтанно), другие флуоресцентными (излучающими свет в ответ на возбуждение светом). Так, например, люминесцентный белок экварин, выделяемый из морской медузы, излучает свет в присутствии Ca^{2+} и реагирует на изменение концентрации Ca^{2+} в пределах от 0,5-10 мкМ. Если акварин инъецировать в яйцеклетку, а затем ее оплодотворить, в цитоплазме происходит изменение концентрации Ca^{2+}, регистрируемое по вспышке света, который излучает экварин (рис. 4-35). Недавно были синтезированы флуоресцентные индикаторы, прочно связывающиеся с Ca^{2+} . Показано, что в свободном состоянии они излучают свет большей длины волны нежели связанная форма. Измеряя изменение интенсивности флуоресценции при двух длинах волн, излучаемых этим индикатором, можно определить соотношение свободной и Са-связанной фракций индикатора; благодаря этому можно точно оценить концентрацию свободных ионов Ca^{2+} . Два известных индикатора такого типа - *квин-2* и *фура-2* - используют для постоянного наблюдения за изменениями внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в различных участках клеток с помощью флуоресцентного микроскопа. Подобные внутриклеточные индикаторы созданы для измерения внутриклеточного pH. Некоторые из них проникают в клетки за счет диффузии и их не нужно микроинъецировать; в этом случае можно под флуоресцентным микроскопом одновременно наблюдать значительное количество отдельных клеток. Создание новых типов внутриклеточных индикаторов и их использование в комплексе с современными спо-

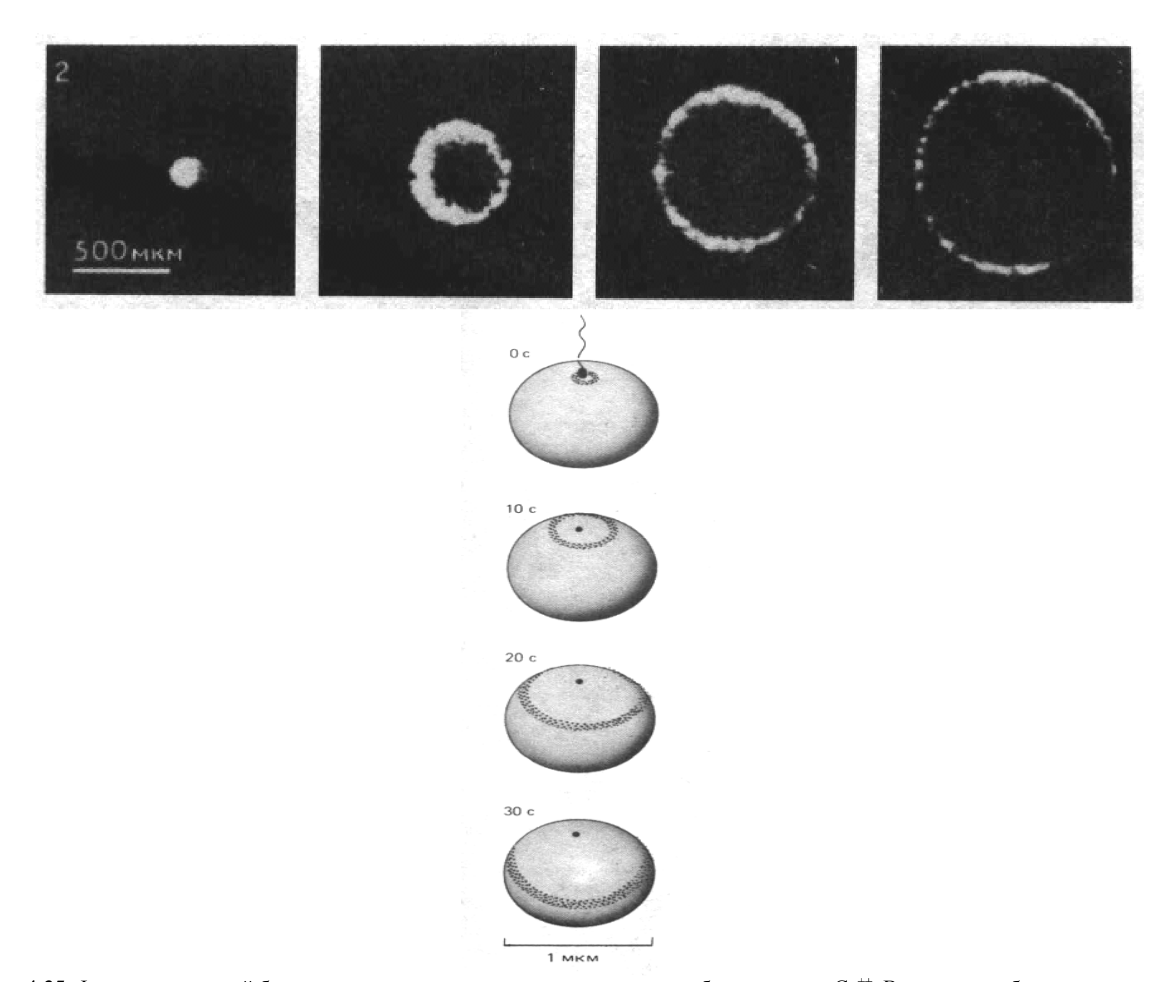


Рис. 4-35. Флуоресцирующий белок, акварин, излучает свет в присутствии свободных ионов Ca^{++}. В икринку рыбы вводили экварин, диффундировавший через цитозоль. Затем проводили искусственное оплодотворение и наблюдали за яйцом, применив метод усиления изображения. Были сделаны четыре фотоснимка со стороны точки проникновения спермия; интервал 10 с. Обнаружено появление в цитозоле волны ионов Ca^{+} , высвобождающихся из внутренних депо, которые расположены непосредственно под клеточной мембраной. Начиная от места проникновения спермия, эта волна проходит через все яйцо, как указано на диаграмме слева. (Фотографии воспроизводятся из J. C. Jinkey, L. F. Jafle, E. B. Ridge-way, J.T. Reynolds J. Cell Biol., 76, 448-476, 1978 Copyright Rockefeller University Press.)

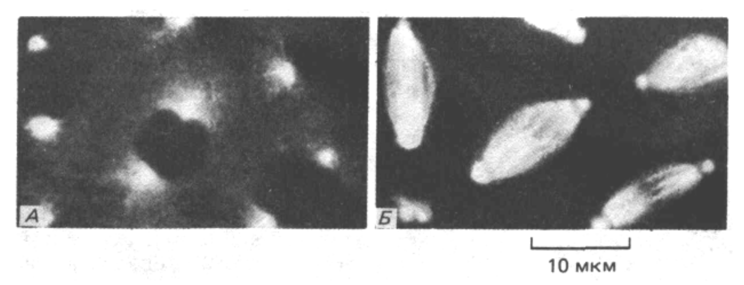


Рис. 4-36. Микрофотографии участка раннего эмбриона *Drosophila,* который инъецирован тубулином, предварительно меченным родамином (тубулин - белок микротрубочек). На этой ранней стадии развития ядра объединены общей цитоплазмой, и поэтому микротрубочки метятся во всем эмбрионе. *А.* Микротрубочки в живом эмбрионе исходят из двух ярких пятен по обе стороны от каждого из интерфазных ядер; в центре каждого пятна центросома. *Б.* Этот же эмбрион через несколько минут, когда все ядра синхронно входят в митоз. Микротрубочки сохраняют контакт с центросомами, но они подверглись реорганизации и сформировали митотическое веретено. (С любезного разрешения Douglas Kel-

собами обработки изображения позволяет разработать быстрые и точные методы измерения внутриклеточной концентрации многих низкомолекулярных веществ.

4.2.4. Существует несколько методов для введения в клетки молекул, не проникающих через мембрану [17]

Иногда возникает потребность введения в клетки молекул, не проникающих через мембрану. Это могут быть светоизлучающие индикаторы (как акварин), клеточные белки, связанные с флуоресцентной меткой, молекулы, которые оказывают влияние на поведение клеток. Один из подходов состоит в микроинъекции молекул в клетки с помощью стеклянной микропипетки. Это очень эффективная методика, сущность которой состоит в следующем: очищенный белок связывается с флуоресцентной меткой и затем его инъецируют в клетки. Используя соответствующий микроскоп, исследователь получает возможность следить за поведением такого белка в процессе роста и деления клеток (рис. 4-36).

Микроинъекции - весьма эффективный и достаточно широко используемый метод, однако важно помнить, что в данном случае процедуре микроинъекции подвергается каждая клетка отдельно, поэтому количество клеток, которые можно наблюдать одновременно, ограничено. Существуют методы, позволяющие одновременно повышать проницаемость клеточных мембран у множества клеток, составляющих клеточные популяции. Для этого используют мощный электрический разряд или химическое воздействие, например, раствором детергента

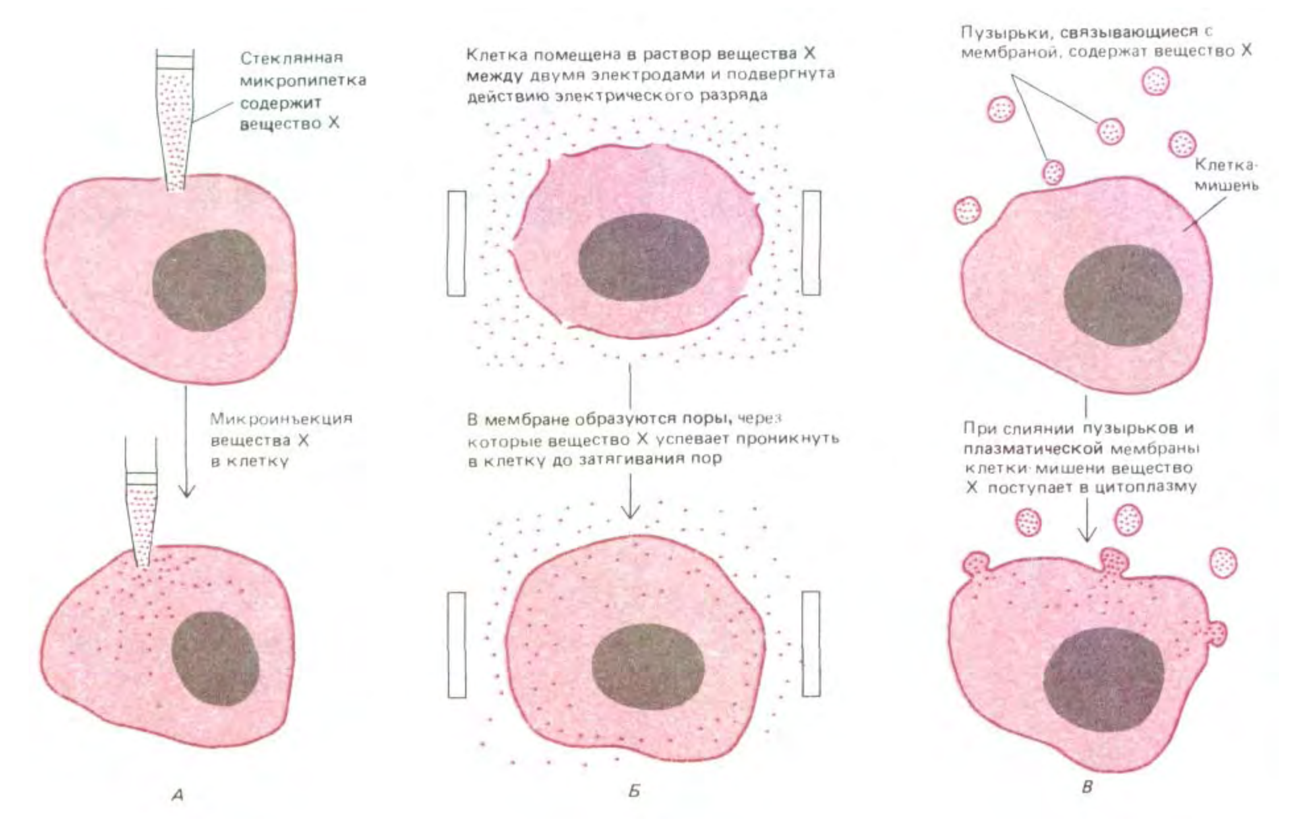


Рис. 4-37. Для внутриклеточного введения веществ, не проникающих через клеточную мембрану, используют три метода. *А.* Вещество в клетку вводят с помощью микропипетки за счет гидравлического давления поршня или электрического заряда вводимых молекул, вследствие чего вещество проникает в клетку в виде потока ионов (метод ионофореза). *Б.* Клеточная мембрана под действием короткого и мощного электрического разряда (2000 в/см в течение 200 мкс) нарушается, что обеспечивает вхождение в клетку определенных веществ. *В.* Использовано слияние мембран. В начале процедуры получают пузырьки, окруженные мембранами (липосомы). Затем липосомы загружают необходимым веществом, смешивая концентрированный раствор этого вещества и суспензию фосфолипидов. Другая модификация этого метода включает на первом этапе нарушение мембраны эритроцитов, приводящее к утрате ими клеточного содержимого, и последующее помещение полученных «теней эритроцитов» в раствор нужного вещества, где происходит их заполнение и затягивание плазматических мембран. Оба вида носителей (как липосомы, так и «тени эритроцитов») можно вводить в клетки-мишени за счет слияния мембран под действием определенных вирусных белков (синтезируемых вирусом для облегчения проникновения в клетки).

низкой концентрации. Электрический разряд создает в плазматической мембране большие поры без повреждения внутриклеточных мембран. Эти поры остаются открытыми в течение нескольких минут и даже часов в зависимости от типа клеток и интенсивности электрического воздействия. Через эти поры даже макромолекулы могут быстро входить в цитозоль или покидать его. При ограниченном воздействии мембрана у значительной части клеток восстанавливается и клетки выживают. Третий метод введения в клетки крупных молекул состоит в слиянии частиц, окруженных мембраной и содержащих необходимые молекулы, с плазматической мембраной клетки. Все три метода широко применяются в клеточной биологии (рис. 4-37).

Заключение

Измерение концентрации и распределения неорганических ионов и других низкомолекулярных веществ в клетках необходимо выполнять на интактной живой ткани. Весьма эффективен для этого ядерный магнитный резонанс (ЯМР). ЯМР представляет собой полностью неинвазивный метод, он используется для измерения относительной концентрации многих малых молекул, но, к сожалению, его применение требует значительного количества образца. Для определения концентрации специфических ионов в отдельных клетках или в отдельных частях клеток можно применять флуоресцентные индикаторные красители. Стеклянные микроэлектроды незаменимы для измерения не только электрических потенциалов и потока ионов через плазматическую мембрану; с их помощью удается определять концентрацию специфических внутриклеточных ионов. Микроэлектроды можно использовать и для инъекции в клетки молекул, не проникающих через мембраны. Альтернативные подходы состоят во временном повышении проницаемости мембран или в слиянии клеток с частицами, окруженными мембранами и содержащими макромолекулы.

4.3. Разделение клеток и их культивирование [18]

Структуру органелл и крупные молекулы можно изучать под микроскопом; для локализации специфических молекул в клетке разработаны эффективные методы окрашивания. Однако, чтобы разобраться в молекулярных основах клеточной организации, необходим детальный биохимический анализ. К сожалению, биохимические методы предполагают использование значительного количества клеток и в процессе исследования клетки разрушаются. Если в качестве образца для биохимического анализа использовать кусочек ткани, то после разрушения будет получена смесь фрагментов различных клеток. И если ткань образована клетками разного типа, что скорее является правилом, чем исключением, то разобраться в этой смеси будет просто невозможно. Пытаясь извлечь максимум информации о всех клетках, составляющих ткани, клеточные биологи разработали методы разделения тканей на клетки и методы выделения отдельных типов клеток. Полученную относительно гомогенную популяцию клеток можно подвергать анализу непосредственно либо предварительно размножив их путем культивирования.

4.3.1. Клетки можно выделить из тканей и разделить на различные типы [19]

Первый этап выделения клеток одного типа из ткани, содержащей различные их типы, состоит в превращении ткани в суспензию отдельных клеток. Это достигается разрушением внеклеточного матрикса и межклеточных контактов, удерживающих клетки. Обычно самый высокий выход жизнеспособных клеток получают из эмбриональных тканей или тканей новорожденных. В этом случае процедура разделения клеток включает обработку ткани протеолитическими ферментами (такими, как трипсин и коллагеназа) и соединениями, связывающими (или *хелатирующими)* Ca^{2+} (такими, как этилендиаминтетрауксусная кислота - ЭДТА), определяющими адгезию клеток. Затем, подвергнув ткани мягкому механическому разрушению, их разделяют на отдельные клетки.

Для фракционирования смешанной суспензии клеток на отдельные типы используют несколько подходов. Один из них основан на различии

в физических свойствах клеток. Например, с помощью центрифугирования можно отделить большие клетки от малых, а тяжелые от легких; эти методы будут рассмотрены нами при обсуждении проблем фракционирования клеток (для чего собственно эти методы и были разработаны). В основе другого подхода лежит способность некоторых клеток прочно прикрепляться к стеклу или пластмассе, что дает возможность отделять такие клетки от других, прикрепляющихся менее прочно.

Важное усовершенствование этого метода подразумевает использование антител. Антитела, специфически связывающиеся с клетками одного типа (из тех, что присутствуют в ткани), можно «пришить» к различным матриксам, например коллагену, полисахаридным шарикам или пластмассе. С такой поверхностью будут связываться лишь клетки, опознаваемые антителами. Связавшиеся клетки отделяют либо с помощью легкого встряхивания, либо путем разрушения матрикса (например, коллагена) ферментами (например, коллагеназой).

Наиболее тонкий метод разделения клеток включает мечение антителами, связанными с флуоресцирующими красителями. С помощью электронного **флуоресцентно-активируемого клеточного анализатора (сортера)** можно отделить меченые клетки от немеченых. Суть метода заключается в том, что отдельные клетки движутся одна за другой в узком потоке и проходят через лазерный луч, где производится оценка наличия флуоресценции. Затем вибрирующее сопло формирует крошечные капельки, большинство из которых содержит только одну клетку либо вообще не содержит клеток. В момент образования капля

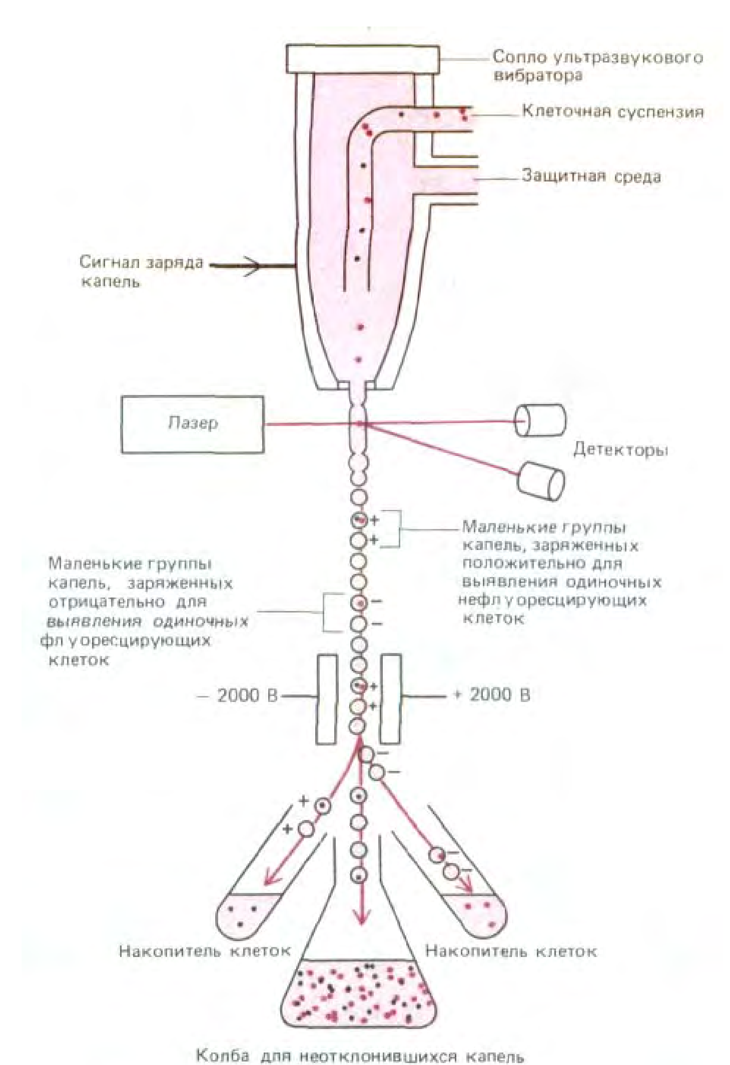


Рис. 4-38. Схема флуоресцентно-активируемого клеточного сортера. Лазерный луч анализирует флуоресценцию проходящих через него клеток. Капельки, содержащие отдельные клетки, в зависимости от наличия флуоресценции клеток заряжаются положительно или отрицательно. Затем капельки направляются в пробирки-накопители согласно заряду. Заметим, что концентрация клеток должна быть подобрана таким образом, чтобы большая часть капель не содержала клеток. Следовательно, большая часть капель наряду с любыми скоплениями клеток направляется в контейнер для отходов.

автоматически приобретает положительный или отрицательный заряд в зависимости от наличия в ней флуоресцирующей клетки. Затем сильное электрическое поле направляет капли в соответствующие контейнеры. Случайные комки клеток опознаются по усилению светорассеяния, они отбрасываются в контейнер для отходов (рис. 4-38). Клеточный анализатор способен отобрать одну клетку из тысячи; каждую секунду он сортирует около 5000 клеток. Получив популяцию одинаковых клеток любым из вышеперечисленных методов, исследователь может использовать их для биохимического анализа. Существует и другая возможность: такие клетки могут быть введены в культуру, что позволяет изучать их поведение и свойства в условиях культивирования.

4.3.2. Клетки можно выращивать в культуральном сосуде [20]

Большинство видов клеток растений и животных в благоприятных условиях способны выжить, размножиться и даже дифференцироваться. Используя методы культуры ткани, можно изучать клетки под микроскопом или анализировать их биохимически. Кроме того, добавляя в культуральный сосуд и удаляя из него специфические молекулы, такие, как гормоны или факторы роста, мы можем судить об их влиянии на клетки. Применение смешанных культур позволяет изучать взаимодействие между различными типами клеток. В научной литературе часто любые эксперименты с клеточными культурами называют экспериментами, выполненными in vitro, что дословно означает «в стекле»; напротив, об экспериментах на живых организмах принято говорить, что они выполнены in vivo. Несколько иной смысл вкладывается в эти термины биохимиками и клеточными биологами. Для них in vitro относится к *биохимическим реакциям,* происходящим вне живых клеток, а in vivo ко всем реакциям, которые имеют место в живых клетках. Рождение метода культуры тканей следует отнести к 1907 году. В то время был задуман эксперимент, который должен был внести ясность в дискуссию среди нейробиологов. Гипотеза, правомочность которой следовало проверить (получившая название *«нейронной доктрины»),* сводилась к следующему: каждое нервное волокно образуется, вырастая из одной нервной клетки, а не путем слияния многих клеток. Для подтверждения этой гипотезы небольшие кусочки спинного мозга помещали в теплую влажную камеру и наблюдали под микроскопом через равные промежутки времени. Примерно через сутки можно было видеть, что от отдельных нервных клеток начинают отходить длинные тонкие отростки. Так были получены данные, свидетельствовавшие в пользу нейронной доктрины, и был заложен фундамент для переворота, происшедшего в результате применения метода клеточных культур.

Основополагающие эксперименты, проведенные в 1907 году, включали использование небольших фрагментов ткани или **эксплантатов.** В наше время культуры обычно готовят из клеточной суспензии, полученной путем диссоциации ткани. Большинство клеток, образующих ткани многоклеточных организмов, в отличие от бактериальных клеток не способны расти в суспензии. Для роста и деления им необходима твердая поверхность. Вначале, когда метод культивирования только появился, в качестве механической опоры использовали сгусток плазмы, но в настоящее время его обычно заменяют поверхностью пластиковой культуральной чашки (рис. 4-39). Клетки очень различаются по своим потребностям; некоторые из них способны расти или дифференцироваться только в том случае, если культуральная чашка покрыта компонентами внеклеточного матрикса, например коллагеном.



Рис. 4-39. Микрофотография фибробластов крысы, растущих в культуре ткани, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения Gunther Albrecht-Buchler.)

Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма, с использованием первичного этапа фракционирования клеток и без оного, называют **первичными культурами.** В большинстве случаев клетки первичной культуры можно перенести из культуральной чашки и использовать для получения большого количества **вторичных** культур, которые можно последовательно перевивать в течение недель или месяцев. Часто эти клетки сохраняют признаки дифференцировки тех тканей, из которых они были получены. Так, фибробласты продолжают синтезировать коллаген, клетки скелетных мышц эмбриона сливаются, образуя гигантские мышечные волокна, которые спонтанно сокращаются в чашках для культуры тканей; у нервных клеток возникают аксоны. характеризующиеся электровозбудимостью и способностью формировать синапсы с другими нервными клетками; клетки эпителия формируют обширные слои, сохраняющие многие свойства интактного эпителия. Поскольку все эти события можно наблюдать при росте клеток в культуре, для их изучения используют многие методы, недоступные при работе с интактными тканями.

4.3.3. С помощью сред определенного химического состава можно идентифицировать специфические факторы роста [21]

До начала 70-х годов культивирование ткани представляло собой нечто вроде смеси науки и колдовства. Хотя на смену сгусткам плазмы пришли пластмассовые чашки и жидкие среды с точно составленной смесью солей, аминокислот и витаминов, все же в большинстве сред содержалось небольшое количество плохо охарактеризованного биологического материала, например лошадиная сыворотка, очищенный экстракт из куриных эмбрионов или эмбриональная сыворотка коровы. Для большинства обычных тканевых культур такие среды используются до сих пор (табл. 4-4), но они не пригодны для изучения особых потребностей, возникающих в процессе роста и дифференцировки клеток.

Все это привело к тому, что были разработаны специальные среды определенного химического состава, используемые для культивирования клеток различных типов. В этих средах известен каждый из компонентов. Наряду с низкомолекулярными веществами они, как правило, содержат один или несколько различных белковых **факторов** роста, необходимых клеткам для выживания и пролиферации в культуре: например, некоторым нервным клеткам как в культуре, так и в

Таблица 4-4. Состав стандартной среды для культивирования клеток млекопитающих [1)]

Аминокислоты	Витамины	Соли	Другие соединения
Аргинин	Биотин	*NaCl*	Глюкоза
Валин	Никотинамид	*KC1*	Пенициллин
Гистидин	Пантотенат	NaH_2PO_4	Стрептомицин
Глутамин	Пиридоксаль	$NaHCO_3$	Феноловый красный
Изолейцин	Рибофлавин (B_2)	$CaC1_2$	
Лейцин	Тиамин (B1)	$MgCl_2$	Сыворотка цельная
Лизин	Фолиевая кислота		
Метионин	Холин		
Тирозин			
Треонин			
Триптофан			
Фенилаланин			
Цистин			

[1)] Концентрация глюкозы должна составлять 5-10 мМ. Все аминокислоты применяют в L-форме; за исключением одного или двух случаев, их используют в концентрации 1 или 2 мМ. Концентрация витаминов должна быть в 100 раз ниже, т. е. примерно 1 мкМ. Концентрация сыворотки (лошадиной или теленка) должна составить 10% от общего объема. Пенициллин или стрептомицин - антибиотики, добавляемые для подавления бактериального роста. Феноловый красный - индикатор pH; используется для поддержания pH 7,4.

Для культивирования обычно применяют пластиковые или стеклянные контейнеры, поверхность которых обработана так, чтобы к ней могли прикрепляться клетки. Контейнеры помещают в инкубатор при 37°C в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха.
организме животного необходимы следовые количества *фактора, стимулирующего рост нервов.* Были открыты и другие факторы подобного типа, имеющие жизненно важное значение для развития клеток определенных типов и поддержания их нормального существования. Появление сред определенного химического состава значительно облегчило поиск новых факторов.

4.3.4. Для получения гомогенных клеток обычно используют клеточные линии эукариот [18]

Большинство клеток млекопитающих в культуре погибает после определенного числа делений; клетки кожи человека, например, прежде чем погибнуть, делятся 50-100 раз. Существует предположение, что ограниченный срок жизни клеток в культуре отражает ограниченный срок жизни организма, из которого были получены эти клетки. Иногда в культуре появляются мутантные клетки, которые практически бессмертны. Они могут размножаться бесконечно и образуют **клеточную линию** (табл. 4-5). Эти клетки лучше растут на твердой поверхности и после образования *непрерывного слоя* их рост, как правило, прекращается.

Обычно мутантные клетки, способные к непрерывному делению, все же отличаются от раковых клеток, способных к непрерывному делению и in vilro, и in vivo. В отличие от других клеточных линий раковые клетки могут расти, не прикрепляясь к какой-либо твердой поверхности, и образуют в культуральных чашках популяцию более плотную, чем популяции обычных клеток. Аналогичное свойство можно вызвать экспериментально и у нормальных клеток путем *трансформации* их опухолеродными вирусами или каким-либо соединением. Полученные таким образом **неопластически трансформированные клеточные линии** способны вызывать образование опухолей после введения в организм

Таблица 4-5. Некоторые наиболее известные клеточные линии

Клеточная линия [1)]	Тип клеток и соответствующий организм
ЗТЗ	Фибробласт (мышь)
ВНК21	Фибробласт (сирийский хомячок)
HeLa	Эпителиальная клетка (человек)
PtKl	Эпителиальная клетка (кенгуровая крыса)
L6	Миобласт (крыса)
PC12	Хромаффинная клетка (крыса)
SP2	Плазматическая клетка (мышь)

[1)] Многие из этих клеточных линий имеют опухолевое происхождение. Все они способны размножаться в культуре тканей бесконечно долго и проявляют (по крайней мере частично) свойства, характерные для тканей, из которых происходят. Клетки линий ВНК21, SP2, HeLa способны расти в суспензии, другим клеткам для размножения необходима твердая опора.

животных. И трансформированные, и нетрансформированные клеточные линии служат источником большого количества клеток одного типа и поэтому представляют большую ценность для исследователя. Такие клеточные линии имеют еще то преимущество, что при — 70°C их можно хранить неопределенно долго и при этом они сохраняют способность производить жизнеспособные клетки после размораживания. При этом необходимо отдавать отчет в том, что клетки обоих типов клеточных линий практически всегда существенным образом отличаются от своих нормальных предшественников в тканях, из которых они были получены.

Генетическую однородность клеточных линий можно усилить еще больше путем **клонирования,** т. е. выделив отдельную клетку и позволив ей пролиферировать до образования большой колонии. Клон - этого популяция клеток, происходящих из одной клетки-предшественника,

Клонирование клеток используется в основном для получения клеточных линий, у которых мутация затронула определенные гены. Исследование таких мутантных клеток, дефектных по специфическому белку, позволяет узнать много нового о функции белка в нормальных клетках.

4.3.5. Слияние клеток приводит к образованию клеточных гибридов [22]

Две клетки, сливаясь, образуют **гетерокарион -** одну комбинированную клетку с двумя ядрами. Обычно, чтобы осуществить слияние клеток, клеточную суспензию обрабатывают инактивированными вирусами, или полиэтиленгликолем. Оба этих агента повреждают плазматическую мембрану клетки, что и приводит к слиянию клеток. Образование гетерокарионов дает возможность смешивать компоненты двух отдельных клеток с целью изучения их взаимодействия. Например, если неактивное ядро куриного эритроцита попадает в результате слияния в цитоплазму клетки, растущей в культуре ткани, то такое ядро реактивируется: начинается синтез РНК, а затем и репликация ДНК. Именно в опытах по гибридизации клеток мыши и клеток человека впервые были получены данные, свидетельствующие о том, что белки поверхности клеток человека и мыши, находившиеся вначале на своих половинках гетерокариона, быстро диффундируют и перемешиваются по всей его поверхности.

По истечении определенного времени гетерокарион делится митотически, образуя в результате **гибридную клетку.** Ядерные оболочки

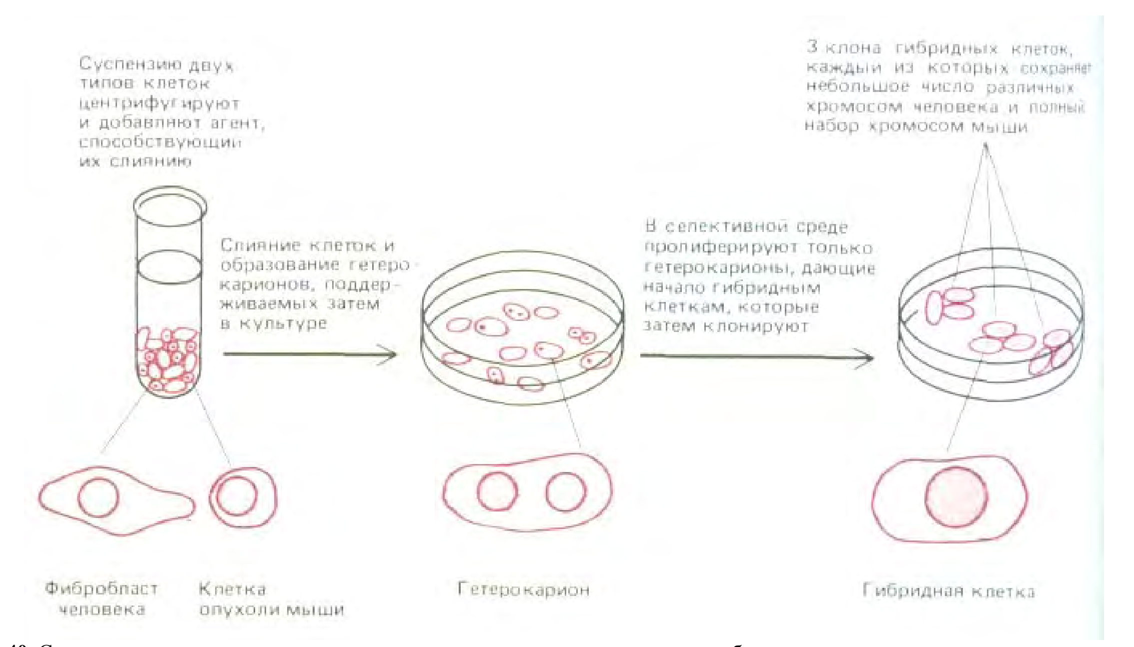


Рис. 4-40. Схема, иллюстрирующая слияние клеток человека и мыши, приводящее к образованию гетерокарионов, имеющих по одному или более ядер. В некоторых случаях из гетерокарионов образуются гибридные клетки с одним слившимся ядром. Такие гибридные клетки используются для картирования индивидуальных генов в определенных хромосомах человека. Возможность такого картирования обусловлена тем, что гибридизация сопровождается быстрой потерей большинства хромосом человека, происходящей случайным образом. В образующихся клонах сохраняется только одна или несколько хромосом человека. В гибридных клетках, образованных в результате слияния клеток других типов, часто сохраняется большинство исходных хромосом.

Таблица 4-6. Основные вехи в развитии метода культуры тканей

1885 - **Ру** (Roux) показал, что клетки куриного эмбриона сохраняют жизнеспособность в солевом растворе вне тела животного	
1907 - **Гаррисон** (Harrison) культивировал спинной мозг амфибий в сгустке плазмы. Он пытался показать, что аксоны образуются в виде выростов отдельных нервных клеток	
1910 - **Раус** (Raus) индуцировал опухоль, использовав профильтрованный экстракт куриной опухоли, содержащей, как позже было установлено, РНК-вирус (вирус саркомы Рауса)	
1913 - **Каррель** (Carrel) доказал, что в асептических условиях клетки могут расти в культуре в течение длительного времени, если их обеспечить необходимыми питательными веществами	
1948 - **Эрл** (Earle) и сотрудники установили, что одиночные клетки линии L в культуре формируют клоны клеток	
1952 - **Джей** (Gey) и сотрудники получили перевиваемую клеточную линию из карциномы шейки матки; эта клеточная линия широко известна как HeLa	
1954 - **Леви-Монтальчини** (Levy-Montalchini) и сотрудники показали, что в культуре ткани фактор, стимулирующий рост нервов, вызывает рост аксонов	
1955 - **Игл** (Eagle) - впервые систематически исследовал пищевые потребности клеток в условиях культуры ткани и обнаружил, что клетки животных способны существовать в определенной смеси низкомолекулярных веществ, дополненной некоторым количеством белков сыворотки	
1956 - **Пак** (Puck) и сотрудники отобрали мутантные клетки HeLa, потребности которых для роста в культуре существенно отличались от потребностей других клеток	
1958 - **Темин и Рубин** (Temin, Roubin) количественно описали инфицирование клеток цыпленка в культуре очищенным вирусом *саркомы Рауса.* В течение следующего десятилетия Стокер, Дульбекко, Грин (Stocker, Dulbecco, Green) и другие вирусологи установили основные характеристики вирусной трансформации различных типов	
1961 - **Хайфлик и Мурхед** (Hayflick, Moorhend) показали, что в культуре фибробласты человека погибают после определенного числа делений	
1964 - **Литлфилд** (Littlefield) впервые использовал для выращивания гибридов соматических клеток селективную среду HAT. Это нововведение в сочетании с методом гибридизации клеток позволило приступить к изучению генетики соматических клеток **Като и Такеуши** (Kato, Takeuchi) получили целое растение моркови из растущей в культуре тканей клетки корня	
1965 - **Хэм** (Ham) предложил бессывороточную среду определенного химического состава, которая способна поддерживать рост клонов некоторых клеток животных	
1965 - **Харрис и Уоткинс** (Harris, Watkins) индуцировали вирусом слияние клеток мыши и человека и получили первые гетерокарионы клеток млекопитающих	
1968 - **Августи-Точчо и Сато** (Augusti-Tocco, Sato) адаптировали к условиям культуры клеток опухолевые клетки мыши (нейробластомы) и выделили клоны, которые реагировали на раздражение электрическим током и разрастались в нервные волокна. Одновременно получено большое количество других дифференцированных клеточных линий, включая линии скелетных мышц и печени	
1975 - **Келер и Мильштейн** (Kehler, Milstein) получили первые клеточные линии гибридом, секретирующих моноклональные антитела	
1976 - **Сато** (Sato) и сотрудники опубликовали первую серию статей, в которых было показано, что для роста в бессывороточной среде разным клеточным линиям необходимы различные смеси гормонов и факторов роста	

у этой клетки разрушаются, все хромосомы объединяются в одно большое ядро (рис. 4-40). Хотя такие гибридные клетки можно клонировать и получить гибридную клеточную линию, первичные гибридные клетки оказываются нестабильными и теряют хромосомы. По неизвестным причинам гибридные клетки «мышь - человек» в основном

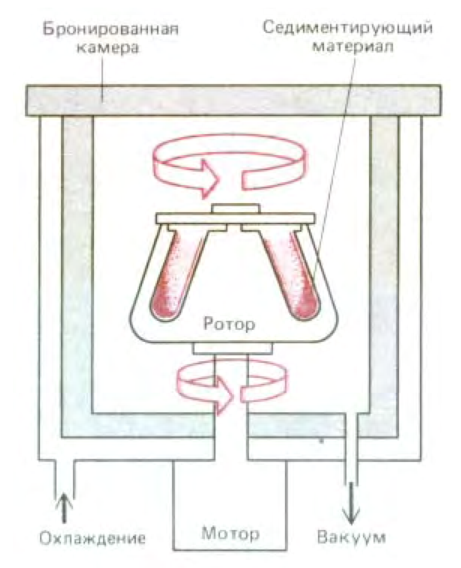


Рис. 4-41. Препаративная ультрацентрифуга. Исследуемый образец находится в пробирках, помещенных в расположенные по кругу цилиндрические гнезда в металлическом роторе. При быстром вращении ротора развивается значительная центробежная сила, под воздействием которой частицы исследуемого образца осаждаются. В условиях вакуума трение снижается; в результате ротор не нагревается и вмонтированная в ротор система поддерживает температуру образца при 4°С.

теряют хромосомы человека. В результате образуется множество гибридных линий «мышь - человек», каждая из которых содержит одну или несколько хромосом человека. Это явление оказалось полезным для картирования и локализации генов в геноме человека. Например, инсулин человека синтезируют только те гибридные клетки, которые содержат хромосому 11 человека, следовательно, ген, кодирующий инсулин, находится именно на этой хромосоме.

Некоторые важные этапы развития метода культуры тканей перечислены в табл. 4-6.

Заключение

Клетки эмбриональных тканей и тканей новорожденных используются в качестве исходного материала для выделения специфических типов клеток, которые можно исследовать биохимически либо использовать для создания клеточных культур. Многие клетки растений и животных выживают и часто способны пролиферировать в культуральной чашке при наличии питательной среды соответствующего состава. Разные типы клеток нуждаются в различных питательных веществах, в том числе в одном или нескольких белковых факторах роста. Большинство клеток животных погибает после конечного числа делений, но иногда в культуре клеток спонтанно возникают редкие варианты, способные поддерживаться бесконечно долго в виде клеточных линий. Клеточные линии можно использовать для получения клонов, которые происходят из одиночной клетки-предшественника. Так, можно выделить мутантные клетки, дефектные по одному белку. Можно осуществить слияние различных типов клеток с образованием гетерокарионов (клеток с двумя ядрами), из которых в конечном счете образуются гибридные клетки (ядра клеток которых слились воедино). Гибридные клетки можно использовать для изучения взаимодействия компонентов двух различных клеток. Кроме того, этот метод позволяет ответить на вопрос, в каких конкретно хромосомах находятся те или иные гены.

4.4. Фракционирование клеточного содержимого [23]

Биохимический анализ часто сопряжен с разрушением тонкой структуры клеток. Однако в настоящее время разработаны методы мягкого фракционирования клеточного содержимого, целью которых является сохранение функции различных клеточных компонентов. Подобно тому как ткань можно разделить на составляющие клетки различных типов, клетки можно разделить на ее функциональные органеллы и макромолекулы. В этом разделе мы сосредоточим внимание на методах, позволяющих проводить очистку органелл и белков. Родственные методы мечения макромолекул радиоизотопами и антителами, равно как и чрезвычайно эффективные методы анализа ДНК и функции генов, обсуждаются в последующих разделах.

4.4.1. С помощью ультрацентрифугирования можно разделять органеллы и макромолекулы [24]

Существует несколько способов разрушения клеток: их можно подвергнуть осмотическому шоку, ультразвуковой вибрации, продавить через маленькое отверстие или измельчить. При этом мембраны клеток (в том числе плазматическая мембрана и мембрана эндоплазматического ретикулума) распадаются на фрагменты, которые сразу же замыкаются, образуя мельчайшие пузырьки. При осторожном применении методов разрушения некоторые органеллы сохраняются в интактном состоянии (ядра, митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и перокси-

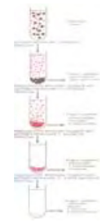


Рис. 4-42. Схематически показано фракционирование субклеточных компонентов из экстрактов клеток путем повторного центрифугирования при постепенно возрастающих скоростях. В общем случае чем меньше по размерам субклеточный компонент, тем более высокая центробежная сила требуется для его осаждения. Обычно на различных этапах центрифугирования требуются следующие условия: низкая скорость - 1000 g - 10 мин, средняя скорость - 20 000 g - 20 мин, высокая скорость - 80000 g - 1 ч, очень высокая скорость - 150000 g - 3 ч.

сомы). Таким образом, суспензия клеток превращается в растворимый экстракт, содержащий довольно грубую суспензию связанных с мембранами частиц, обладающих характерными размерами, зарядом и плотностью. Было показано, что при правильном выборе среды для гомогенизации (а это требует тщательного анализа методом проб и ошибок в отношении каждой из органелл) частицы экстракта сохраняют большую часть биохимических свойств, присущих интактным органеллам в клетке.

После того как в начале 40-х годов начали широко использовать **препаративную центрифугу,** разделение различных компонентов гомогената стало вполне реальным. Экстракты разрушенных клеток фракционируют, подвергая их высокоскоростному центрифугированию (рис. 4-41). Такая обработка делит клеточные компоненты по их размеру: более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее. Крупные компоненты экстракта, в том числе ядра или неразрушенные клетки, быстро оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. При более высокой скорости выпадают в осадок митохондрии, а при еще более высоких скоростях и длительных периодах центрифугирования осаждаются мелкие замкнутые пузырьки (микросомы), а затем рибосомы (рис. 4-42). Все эти фракции загрязнены, но если процедуру ресуспендирования осадка и центрифугирования повторить несколько раз, то многие примеси исчезнут.

Центрифугирование является, как правило, первым этапом фракционирования, с его помощью разделяются только значительно отличающиеся по размеру компоненты. Чтобы достигнуть более высокой степени разделения фракций, необходимо гомогенат наслоить тонким слоем поверх солевого раствора. При центрифугировании различные фракции седиментируют с различной скоростью и образуют отдельные полосы, которые можно выделить (рис. 4-43). Во избежание перемешивания осажденных компонентов солевой раствор должен содержать инертный и хорошо растворимый материал (например, сахарозу), плотность которого постепенно увеличивается сверху вниз, формируя *градиент плотности.*

При седиментации сквозь такие градиенты сахарозы различные компоненты клетки собираются в отдельные полосы, которые можно выделить (см. рис. 4-43). Скорость седиментации каждого из компонентов определяется его размерами и формой и обычно выражается с помощью *коэффициента седиментации,* обозначаемого S (см. табл. 4-7). Ротор в современных центрифугах вращается со скоростью до 80000 об/мин, так что на разделяемые частицы действуют силы, превосходящие силу тяготения более чем в 500000 раз. Под действием столь больших сил даже сравнительно небольшие макромолекулы, такие, как тРНК или простейшие ферменты, разделяются и распределяются в строгом соответствии со своими размерами. Измерение коэффициента седиментации макромолекулярных комплексов обычно используют для определения их общей массы и количества входящих в их состав субъединиц.

Ультрацентрифуга разделяет клеточные компоненты не только по массе, но и по *плавучей плотности.* В этом случае образец седиментирует в крутом градиенте, образованном высококонцентрированным раствором сахарозы или хлористого цезия. Компоненты клеток опускаются по градиенту до тех пор, пока не достигнут участка, плотность раствора в котором равна собственной плотности компонентов. Дальнейшей седиментации компонентов не происходит и они «застревают» на этом уровне. Таким образом в центрифужной пробирке возникает набор различных полос, причем полосы прилежащие к дну пробирки, содержат



Рис. 4-43. Образец субклеточных компонентов наносят поверх разведенного субклеточного раствора сахарозы и осаждают при различных скоростях в зависимости от размера. В пробирке устанавливается непрерывный градиент плотности сахарозы, концентрация которого возрастает в направлении дна пробирки (обычно используют концентрацию сахарозы в пределах 5-20%). Градиент концентрации сахарозы необходим для стабилизации раствора и седиментирующих полос в условиях конвекции. После центрифугирования различные компоненты можно, как правило, собрать в отдельности. Для этого пластмассовую центрифужную пробирку прокалывают и собирают капли со дна, как это показано на рисунке.

компоненты максимальной плавучей плотности. Данный метод настолько чувствителен, что с его помощью можно отделять немеченые макромолекулы от макромолекул, содержащих тяжелые изотопы ^{13}C или ^{15}N). Метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия был разработан в 1957 году для разделения меченой и немеченой ДНК, синтезированной бактериями в присутствии нуклеотидов, меченных ^{15}N. С помощью этого теперь уже классического эксперимента было показано, что репликация ДНК осуществляется полуконсервативным путем (см. разд. 3.2.3).

4.4.2. Детали сложных внутриклеточных процессов на молекулярном уровне можно расшифровать в бесклеточных системах [25]

Изучение органелл или других крупных субклеточных компонентов, выделенных с помощью ультрацентрифугирования, чрезвычайно важно для понимания их функций в клетке. Благодаря получению очищенных фракций митохондрий и хлоропластов удалось установить ключевую роль этих органел в процессе превращения энергии. Разделение замкнутых пузырьков, образованных фрагментами гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, позволило использовать эти пузырьки в качестве функциональных моделей интактных органелл. Фракционированные клеточные экстракты, называемые также **бесклеточными** системами, широко используются для изучения внутриклеточных процессов. Только работая с бесклеточными экстрактами можно установить молекулярный механизм биологических процессов, поскольку лишь в этом случае исследуемый механизм может быть изучен в чистом виде - без помех, создаваемых происходящими в клетке побочными реакциями. Использование бесклеточных систем принесло первый триумфальный успех при изучении механизмов биосинтеза белка. Отправной точкой в данном случае послужил неочищенный клеточный экстракт, способный транслировать молекулы РНК в белок. После многократного фракционирования этого экстракта были получены рибосомы, РНК и различные ферменты, составляющие в совокупности аппарат биосинтеза белка. После получения отдельных компонентов в чистом виде их можно было добавлять в систему и исключать из нее и таким образом уточнять роль каждого компонента в процессе биосинтеза белка. Эта же «система трансляции in vitro» оказалась полезной для расшифровки генетического кода - с использованием в качестве матричной РНК (мРНК) искусственных полинуклеотидов известного состава. В настоящее время различные системы трансляции in vitro применяют и для определения механизмов распределения белков по различным внутриклеточным компартментам (см. разд. 8.6.6.), а также для идентификации белков, кодируемых очищенными препаратами мРНК (очистка мРНК является важным этапом в процедуре клонирования генов (см. разд. 5.6.7). В табл. 4-8 приведены некоторые даты из истории разработки методов фракционирования клеточных экстрактов.

Многое из того, что мы знаем о молекулярной биологии клетки открыто при изучении бесклеточных систем. Именно так удалось выяснить механизмы репликации ДНК, транскрипции ДНК, сплайсинга РНК, мышечного сокращения и транспорта частиц по микротрубочкам. Анализ в бесклеточных системах подразумевает полное разделение всех составляющих ее индивидуальных макромолекулярных компонентов и, в частности всех белков, входящих в систему. Методы разделения белков рассматриваются в последующих разделах.

Таблица 4-7. Некоторые типичные коэффициенты седиментации

Частица или молекула	Коэффициент седиментации, *S*
Лизосома	9400
Вирус табачной мозаики	198
Рибосома	80
Молекула рибосомной РНК	28
Молекула тРНК	4
Молекула гемоглобина	4,5

Коэффициенты седиментации измеряются в секундах и задаются уравнением $(dx/dt)/\omega^2 \cdot x$, где x — расстояние от центра вращения в см, (dx/dt) - скорость осаждения (седиментация) (см/с), ω - угловая скорость вращения ротора центрифуги в радианах в секунду (рад/с). Поскольку такие коэффициенты измеряются очень малыми числами, они обычно выражаются в единицах Сведберга (S), где 1S равен 1×10^{-13} с.

4.4.3. Для фракционирования белков можно использовать хроматографию [26]

В настоящее время хроматография является одним из методов, наиболее широко используемых для фракционирования белков. Первоначально этот метод был разработан для фракционирования низкомолекулярных соединений - Сахаров и аминокислот. Наибольшее распространение получила **распределительная хроматография - метод,** нашедший широкое применение для разделения небольших молекул. В общей форме этот метод состоит в следующем. Каплю образца наносят на специальную бумагу *(хроматография на бумаге)* или пластинку стекла или пластмассы, покрытую тонким слоем инертного сорбента, например, целлюлозы или силикагеля *(хроматография в тонком слое* или *тонкослойная хроматография).* Затем такую пластинку одним концом помещают в смесь растворителей (например, воды и спирта). По мере движения растворителей по пластинке, они подхватывают те молекулы образца, которые растворяются в них. Растворители выбирают таким образом, чтобы они связывались сорбентом по-разному. В результате молекулы образца, более растворимые в связанном растворителе, движутся медленнее, а другие, более растворимые в слабо сорбированном растворителе, движутся быстрее. Через несколько часов пластинку сушат, окрашивают и определяют положение различных молекул (рис. 4-44).

Белки чаще всего разделяют методом хроматографии на колонках *(колоночная хроматография).* В этом случае смесь молекул в растворе пропускают через колонку, содержащую твердый пористый матрикс. В результате взаимодействия с матриксом различные белки проходят через колонку с различной скоростью. После того как разные белки

Таблица 4-8. Основные вехи в развитии метода ультрацентрифугирования и приготовления бесклеточных экстрактов

1897 - **Бюхнер** (Buchner) показал, что бесклеточные экстракты дрожжей способны расщеплять сахара с образованием двуокиси углерода и этилового спирта. Так были заложены основы энзимологии

1926 - **Сведберг** (Svedberg) изобрел аналитическую центрифугу и использовал ее для определения молекулярной массы гемоглобина, которая оказалась равной 68000 дальтон

1935 - **Пикелс и Бимс** (Pickels, Beams) несколько усовершенствовали конструкцию центрифуги, что позволило использовать ее для проведения препаративных исследований

1938 - **Беренс** (Behrens) использовал дифференциальное центрифугирование для разделения ядер и цитоплазмы клеток печени. Этот метод был усовершенствован в 40-х и начале 50-х годов
Клодом, Браше, Хогебумом (Claude, Brachet, Hageboom) и другими исследователями, что позволило использовать его для разделения органелл клетки

1949 - **Сент-Дьердьи** (Sent-Geogyi) показал, что изолированные миофибриллы из клеток скелетных мышц сокращаются при добавлении АТР. В 1955 г. аналогичную бесклеточную систему использовал **Хофман-Берлинг** (Hofmann-Berling) для изучения движения жгутика

1951 - **Бракк** (Brakke) использовал центрифугирование в градиенте плотности сахарозы для очистки вирусов растений

1954 - **де Дюв** (de Duve) выделил методом центрифугирования лизосомы, а несколько позже пероксисомы

1954 - **Замечник** (Samechnik) получил первую бесклеточную систему синтеза белка. За этим открытием последовало десятилетие интенсивных исследований, завершившихся расшифровкой генетического кода

1957 - **Мезелсон, Сталь и Виноград** (Meselson, Stahl, Vinograd) для разделения нуклеиновых кислот разработали метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия

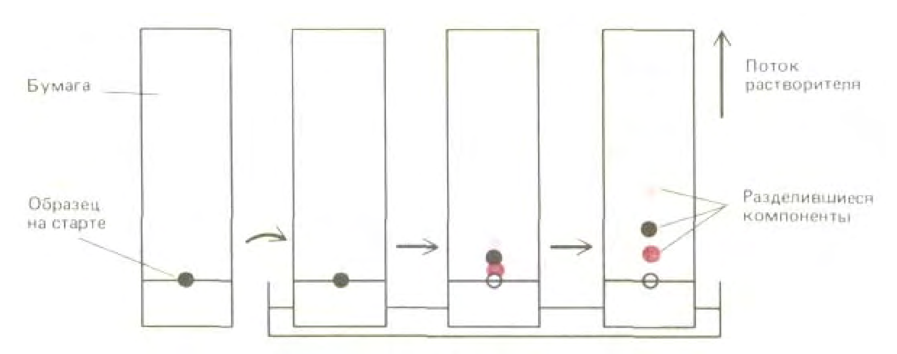


Рис. 4-44. Разделение низкомолекулярных соединений методом хроматографии на бумаге. Образец наносят на старт и высушивают, а затем, используя капиллярный эффект, пропускают сквозь бумагу смесь двух растворителей. Разные компоненты образца движутся по бумаге с различной скоростью, которая зависит от относительной растворимости исследуемых компонентов в растворителе, адсорбируемым бумагой сильнее. Введение этого метода произвело революцию в биохимическом анализе в 40-х годах нашего столетия.

достигнут в определенной последовательности дна колонки, их собирают отдельными фракциями (рис. 4-45). В настоящее время разработано и применяется множество матриксов различных типов, используя которые можно делить белки согласно их заряду *(ионообменная хроматография),* гидрофобности *(гидрофобная хроматография),* размеру *(хроматография гель-фильтрацией)* или способности связываться различными химическими группами *(аффинная хроматография).*

В продаже имеется значительный выбор матриксов различных типов (рис. 4-46). *Ионообменные колонки* набиты маленькими шариками, заряженными положительно или отрицательно. При использовании таких колонок фракционирование белков происходит в соответствии с расположением зарядов на поверхности белковых молекул. *Гидрофобные колонки* наполнены шариками, из которых выступают гидрофобные цепи; в таких колонках задерживаются белки с обнаженными гидрофобными участками. Колонки, предназначенные для *гель-фильтрации,* заполнены крошечными пористыми шариками; при использовании таких колонок происходит разделение белков по размерам. Молекулы небольшого размера по мере прохождения через колонку проникают внутрь шариков, а более крупные молекулы остаются в промежутках между шариками. В результате они быстрее проходят через колонку и выходят из нее первыми. Гель-фильтрация обычно используется и для разделения молекул, и для определения их размеров.

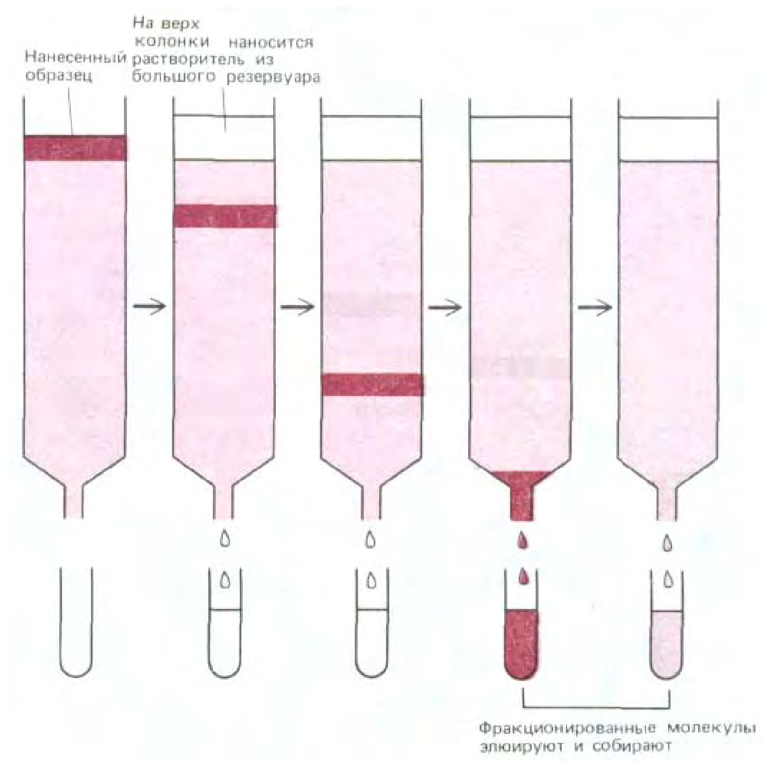


Рис. 4-45. Разделение молекул методом хроматографии на колонках. Образец наносят на верх цилиндрической стеклянной или пластиковой колонки, заполненной проницаемым матриксом (например, целлюлозой), погруженным в растворитель. Затем через колонку медленно прокачивают значительное количество растворителя, который собирают со дна колонки в отдельные пробирки. Различные компоненты образца проходят через колонку с различной скоростью, что и лежит в основе их фракционирования.

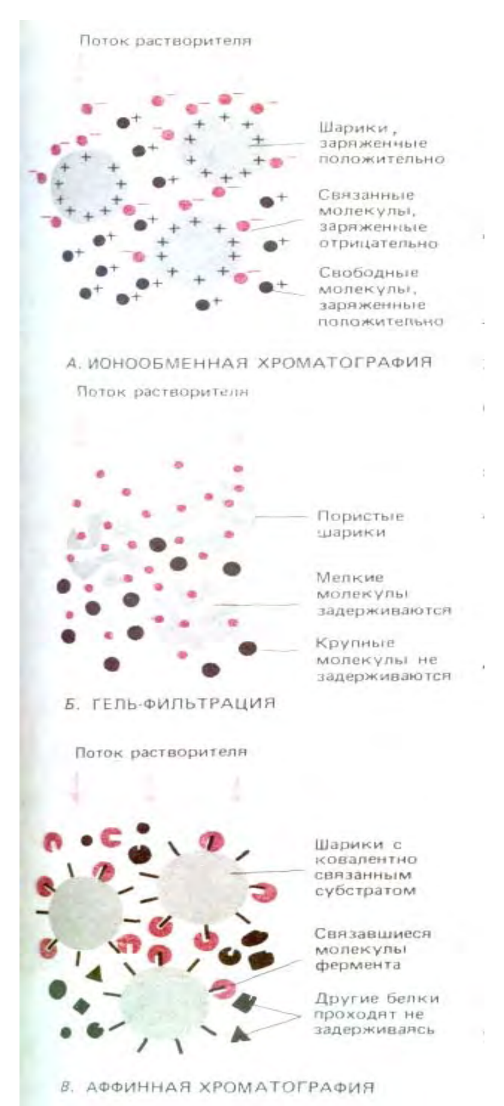


Рис. 4-46. Три типа матриксов, используемых для хроматографии. При ионообменной хроматографии *(А)* нерастворимый матрикс содержит ионы, задерживающие молекулы с противоположным зарядом. Для разделения молекул используются следующие матриксы: диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза) - заряжена положительно; карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) и фосфоцеллюлоза - заряжены отрицательно. Силы взаимодействия между молекулами в растворе и ионообменником определяются ионной силой и pH элюирующего раствора, которые для достижения эффективного разделения можно варьировать определенным образом (как на рис. 4-47). При хроматографии по методу гель-фильтрации *(Б)* матрикс инертен, но содержит поры. Низкомолекулярные соединения проникают внутрь частиц матрикса. Оказавшись при этом в относительно большем объеме, они проходят через колонку медленнее. В качестве матрикса можно использовать зерна поперечно-сшитого полисахарида (декстран или агароза). Поскольку в продаже имеются полисахариды с самым различным размером пор, их можно использовать для фракционирования молекул с молекулярной массой от 500 до 5×10^6 дальтон. При аффинной хроматографии *(В)* используется нерастворимый матрикс, ковалентно связанный со специфичными лигандами (антителами или субстратом ферментов), которые присоединяют определенный белок. Связываемые иммобилизованным субстратом молекулы фермента можно элюировать концентрированными растворами субстрата в свободной форме, а молекулы, связанные с иммобилизованными антителами, можно элюировать за счет диссоциации комплекса антитело антиген концентрированными растворами соли или растворами низкого или высокого pH. Однократная хроматография на такой колонке позволяет зачастую достигнуть очень высокой степени очистки препарата.

На каждом этапе колоночной хроматографии содержание белка в смеси увеличивается не более, чем в 20 раз, и поэтому выделить из сложной смеси белков отдельный белок за один цикл практически невозможно. На долю каждого белка, как правило, приходится менее 1/1000 всего белка клетки, и для его очистки требуется последовательное использование нескольких различных типов колонок (рис. 4-47). Гораздо более эффективен метод **аффинной хроматографии (хроматография по сродству).** В основе этого метода лежат биологически важные взаимодействия, происходящие на поверхности белковых молекул. Так, при ковалентном связывании субстрата фермента с матриксом, например, с полисахаридными шариками, фермент специфически удерживается матриксом и может быть элюирован (смыт) практически в чистом виде. Подобным образом можно иммобилизировать короткие олигонуклеотиды ДНК определенной структуры (см. разд. 4.6.8) и использовать подобные носители для очистки ДНК-связывающих белков, опознающих данную последовательность нуклеотидов на хромосомах (см. разд. 9.1.8). С матриксом можно связать и специфические антитела; такой носитель очень удобен для очистки белков, узнаваемых этими антителами. Аффинные колонки обладают высокой степенью специфичности; за один цикл хроматографии можно добиться очень высокой степени очистки (1000-10000 раз).

Разрешение обычной колоночной хроматографии ограничено негомогенностью матриксов (например, целлюлозы), что вызывает неравномерное протекание растворителя через колонку. Разработанные недавно хроматографические смолы (в основу которых обычно положен кремний) имеют форму мельчайших сфер от 3 до 10 мкм в диаметре, которые упакованы в специальный чехол и образуют гомогенную колонку. Такие колонки для **высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ)** обеспечивают высокий уровень разрешения.

Поскольку частицы носителя в колонках для ВЖХ упакованы очень плотно, в отсутствие высокого давления скорость потока через них

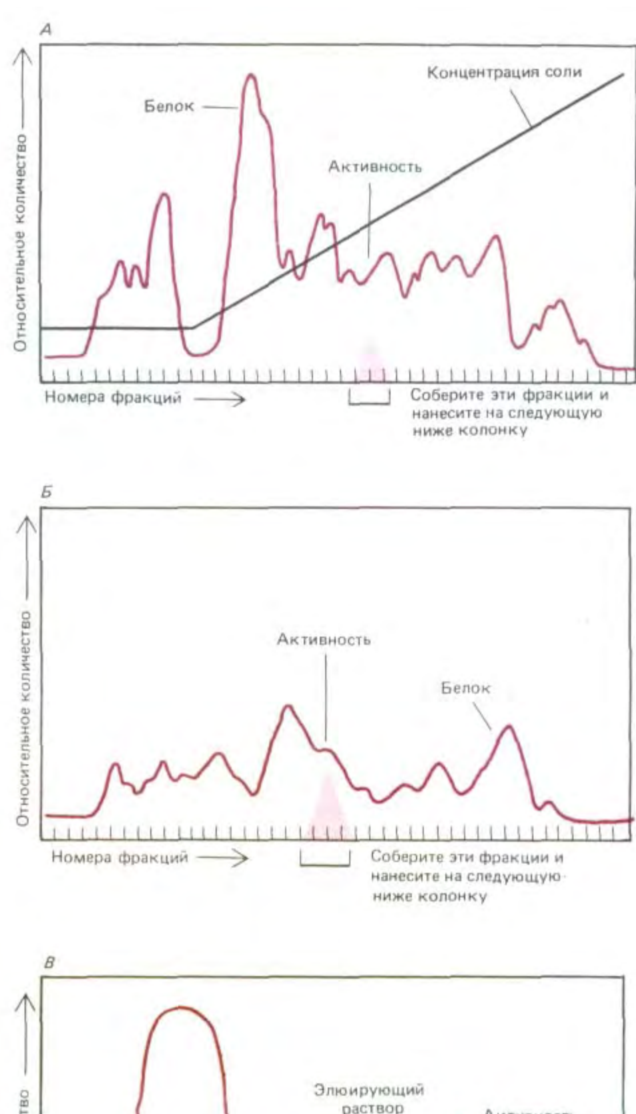


Рис. 4-47. Типичные результаты, полученные при очистке белка различными методами хроматографии. В данном случае подлежащий фракционированию клеточный экстракт сначала пропускали через колонку, заполненную ионообменной смолой *(А)*. Затем колонку промывали и связавшиеся белки элюировали раствором, содержащим постепенно нарастающую концентрацию соли. Белки с наименьшим сродством к ионообменной смоле проходят через колонку не задерживаясь и собираются со дна колонки в первых порциях элюата. Остальные белки элюируются соответственно сродству к ионообменной смоле. Для элюирования белков, связывающихся со смолой наиболее сильно, требуется наивысшая концентрация соли. Исследуемый белок элюировался в виде узкого пика; он был выявлен по ферментативной активности. Фракции с такой активностью собирали и наносили на вторую колонку для гель-фильтрации *(Б)*. Фракцию все еще недостаточно очищенного белка выявляли по ферментативной активности; активные фракции собирали и очищали до гомогенного состояния на колонке *(В)*, содержащей иммобилизованный субстрат фермента.

незначительна. По этой причине такие колонки обычно помещают в стальные цилиндры, соединенные со сложной системой насосов и шлангов, которые обеспечивают необходимое для высокой скорости протока давление. В традиционной колоночной хроматографии скорость протекания через колонку может быть довольно низкой (примерно один объем колонки в час), таким образом, у разделяемых растворов достаточно времени для уравновешивания с внутренним содержимым крупных частиц матрикса. В условиях ВЖХ происходит быстрое уравновешивание растворов с внутренним содержимым крошечных сфер, так что растворы, обладающие различным сродством к матриксу, эффективно разделяются даже при высокой скорости потока. Таким

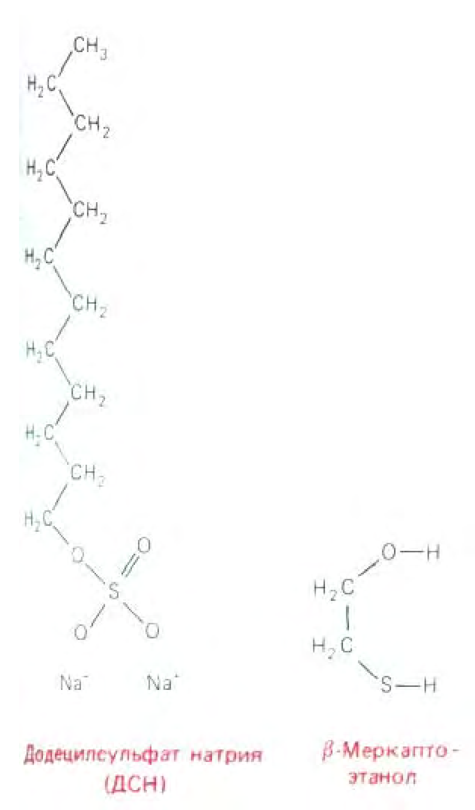


Рис. 4-48. Детергент додецилсульфат натрия (ДСН) в ионизированной форме и восстановитель β-меркаптоэтанол. Эти два реактива используются для солюбилизации белков при ДСН-электрофорезе в полиакриламидном геле.

образом, ранее для достижения плохого разделения с помощью колоночной хроматографии требовались часы, а в настоящее время благодаря ВЖХ качественное фракционирование занимает минуты. Вот почему именно этот метод чрезвычайно популярен сейчас для разделения и белков, и малых молекул.

4.4.4. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) можно определить размеры и субъединичный состав белков [27]

Белки обычно несут суммарный положительный или отрицательный заряд, обусловленный наличием на их поверхности положительно или отрицательно заряженных групп аминокислот. Если белковые молекулы поместить в электрическое поле, они начинают перемещаться со скоростью, которая определяется их суммарным зарядом, а также формой и размерами. Этот феномен лежит в основе **электрофореза - метода** разделения смесей белков в свободных водных растворах и в твердом пористом матриксе, в качестве которого можно использовать крахмал.

В середине 60-х годов был разработан модифицированный метод электрофореза - электрофорез **в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ).** Этот метод был существенным шагом вперед по сравнению с обычными методами анализа белков, известными к тому времени. При использовании данного метода белки мигрируют в инертном матриксе - полиакриламидном геле с высоким содержанием поперечных сшивок. Обычно гель готовят полимеризацией мономеров непосредственно перед использованием. Размеры пор геля могут быть подобраны произвольно с тем, чтобы гель мог замедлить миграцию определенных молекул. При этом белки находятся в растворе, содержащем мощный, отрицательно заряженный детергент - **додецил-сульфат натрия** или **ДСН** (SDS) (рис. 4-48).

Связываясь с гидрофобными участками белковой молекулы, этот детергент вызывает развертывание белковых молекул в длинные вытянутые цепи. Развертываясь, отдельные белковые молекулы освобождаются из комплексов с белками или молекулами липидов и солюбилизируются в растворе детергента. В качестве восстанавливающего агента обычно добавляют меркаптоэтанол (рис. 4-48), разрушающий в белках связи S-S. Это дает возможность анализировать полипептиды, образующие мультисубъединичные молекулы.

Что же произойдет, если смесь белков, растворенных в ДСН, подвергнуть электрофорезу в блоке полиакриламидного геля. Каждая молекула белка связывает значительное количество негативно заряженных молекул детергента, общий заряд которых превосходит общий заряд белка. По этой причине белок после того, как будет приложено напряжение, начнет двигаться в направлении положительного электрода. Белки одного размера ведут себя сходным образом, поскольку, во-первых, их природная структура полностью нарушена ДСН так, что их форма идентична, во-вторых, они связывают одинаковое количество ДСН и приобретают одинаковый негативный заряд. Крупные белки, обладающие большим зарядом, подвергаются действию значительных электрических сил, а также более существенному торможению. В обычных растворах эти эффекты, как правило, взаимно погашаются, но в порах полиакриламидного геля, действующего как молекулярное сито, большие белки тормозятся значительно сильнее, чем малые белки. Вследствие этого сложная смесь белков делится на ряд полос, расположенных в соответствии с их молекулярной массой. Окрасив гель красителем кумасси синим, можно выявить основные фракции полипептидов. Минорные белки идентифицируют серебрением; минимальное

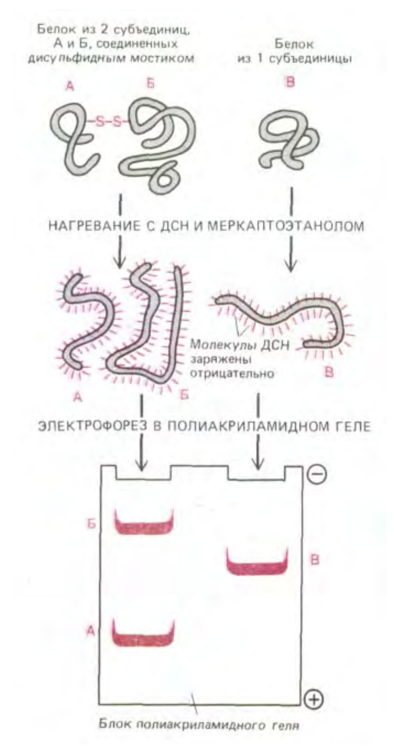


Рис. 4-49. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле. Индивидуальные белки образуют комплекс с молекулами додецилсульфата натрия, несущими отрицательный заряд, и мигрируют через пористый гель полиакриламида в виде отрицательно заряженного комплекса ДСН-белок. Поскольку скорость передвижения в этих условиях тем выше, чем меньше размеры полипептида, этот метод может быть использован для определения приблизительной молекулярной массы полипептидной цепи, а также для изучения субъединичного состава белка.

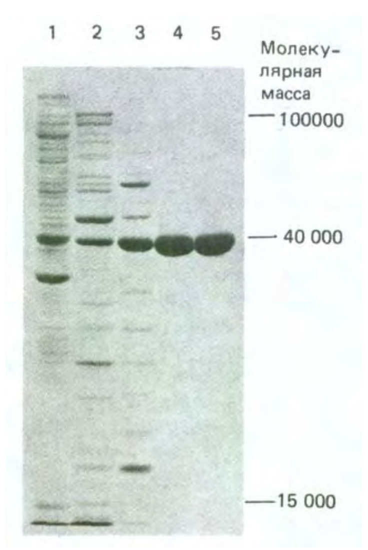


Рис. 4-50. Анализ образцов белка методом электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле. На фотографии показан гель, использованный для выявления белков, присутствующих на последующих стадиях очистки фермента. Самая левая дорожка (дорожка 1) содержит сложную смесь белков исходного клеточного экстракта, каждая из последующих дорожек содержит белки, полученные после хроматографического фракционирования белковых образцов, анализированных на предыдущей дорожке (см. рис. 4-47). В лунку каждой дорожки на гель наносили одинаковое количество белка (10 мкг). Отдельные белки в норме проявляются в виде узких окрашенных полос; полосы расширяются, если в них присутствует слишком много белка. (С любезного разрешения Tim Formosa.)

количество белка, выявляемое в полосе, составляет в последнем случае 10 нг. С помощью таких гелей можно идентифицировать специфический белок, если пометить его антителами, связанными с радиоактивными изотопами, ферментами или флуоресцирующими красителями. Идентификацию часто выполняют после переноса белков из геля на лист нитроцеллюлозы (посредством «блоттинга»). Ниже этот метод описан более подробно применительно к изучению нуклеиновых кислот (см. разд. 4.6.8). Описанный метод выявления белка назван вестерн-блоттингом.

Метод ДСН-электрофореза белков в полиакриламидном геле значительно мощнее любого другого метода фракционирования белков из известных ранее хотя бы потому, что может быть использован для выявления любого белка независимо от его растворимости в воде. С помощью этого метода можно разделить на отдельные фракции белки мембран, белковые компоненты цитоскелета и белки, входящие в состав крупных макромолекулярных агрегатов. При использовании этого метода полипептиды разделяются строго по размеру, поэтому с его помощью можно получить информацию о субъединичном составе любого комплекса и о молекулярной массе белков, образующих этот комплекс (рис. 4-49). Фотография геля, который был использован для анализа последовательных этапов очистки белка, представлена на рис. 4-50.

4.4.5. Методом двумерного гель-электрофореза можно разделить в одном геле более 1000 белков [28]

Известно, что близко расположенные полосы в геле могут перекрываться. Этот эффект препятствует выявлению большого количества белков (не больше 50) с помощью одномерных методов их разделения, **Метод двумерного гель-электрофореза,** в котором объединены две различные процедуры разделения, позволяет идентифицировать более 1000 белков. Результаты при этом получают в виде «двумерной» белковой карты.

При работе данным методом на первом этапе белки разделяют по их заряду. Для этого образец помещают в небольшой объем раствора, содержащего неионный (незаряженный) детергент - меркаптоэтанол, и в качестве денатурирующего агента - мочевину. В этом растворе происходит солюбилизация, денатурация и диссоциация всех без исключения

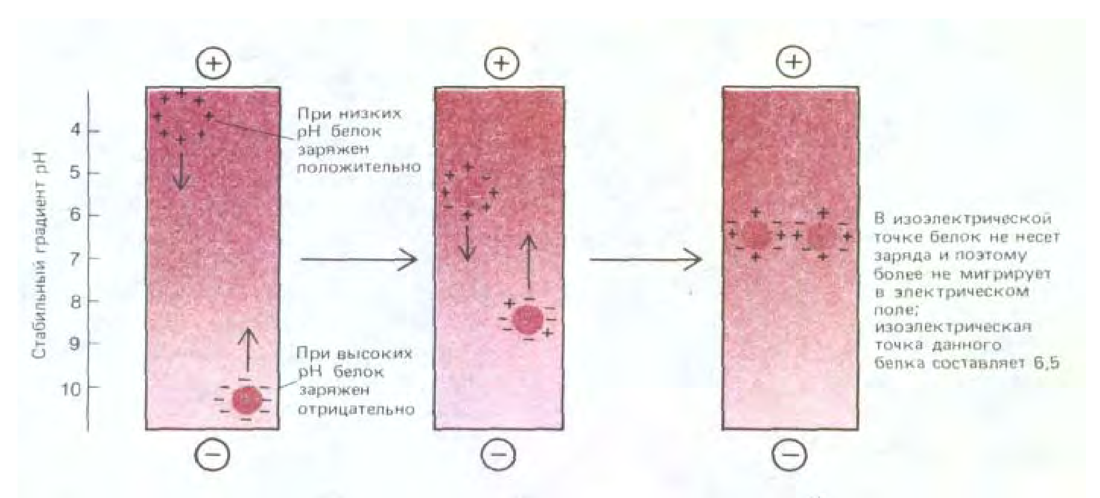


Рис. 4-51. Разделение молекул белка методом изоэлектрического фокусирования. При низких значениях pH (высокое содержание ионов H^+) карбоксильные группы белков имеют тенденцию оставаться незаряженными (—COOH), а основные, азотсодержащие группы белков полностью заряжены (например, $-NH_3^+$), что обусловливает у белков суммарный положительный заряд. При высоких значениях pH карбоксильные группы заряжены отрицательно (— COO^-), а основные группы имеют тенденцию оставаться незаряженными, например (NH_2). В результате белки приобретают отрицательный суммарный заряд (см. рис. 2-8). При изоэлектрической точке белок незаряжен, поскольку положительный и отрицательный заряды уравновешены. Следовательно, если пробирку, содержащую раствор с фиксированным градиентом pH, подвергнуть действию сильного электрического поля, каждый вид белка будет перемещаться до тех пор, пока не образует узкой полосы в зоне pH, соответствующего изоэлектрической точке, как показано на рисунке.

полипептидных цепей; при этом изменения заряда цепей не происходит. Диссоциированные полипептидные цепи разделяют затем методом **изоэлектрического фокусирования,** основанном на изменении заряда белковой молекулы при изменении pH окружающей среды. Каждый из белков может быть охарактеризован *изоэлектрической* точкой - значением pH, при котором суммарный заряд белковой молекулы равен нулю, и, следовательно, белок не способен перемещаться под действием электрического поля. При изоэлектрическом фокусировании белки подвергаются электрофорезу в узкой трубочке, заполненной полиакриламидным гелем, в котором с помощью специальных буферов создается градиент pH. Под действием электрического поля каждый белок перемещается в ту зону градиента, которая соответствует его изоэлектрической точке и остается в ней (рис. 4-51). Так происходит разделение белков в одном направлении двумерного гель-электрофореза.

На втором этапе трубочка геля, содержащего разделенные белки, снова подвергается электрофорезу, на этот раз в направлении перпендикулярном тому, что на первом этапе. В этом случае электрофорез ведут в присутствии ДСН и белки разделяют по их молекулярной массе, как в одномерном ДСН-ПААГ. Исходный гель пропитывают додецил-сульфатом натрия и, поместив его на блок ДСН-ПААГ-геля, проводят электрофорез, в ходе которого каждая из полипептидных цепей мигри-

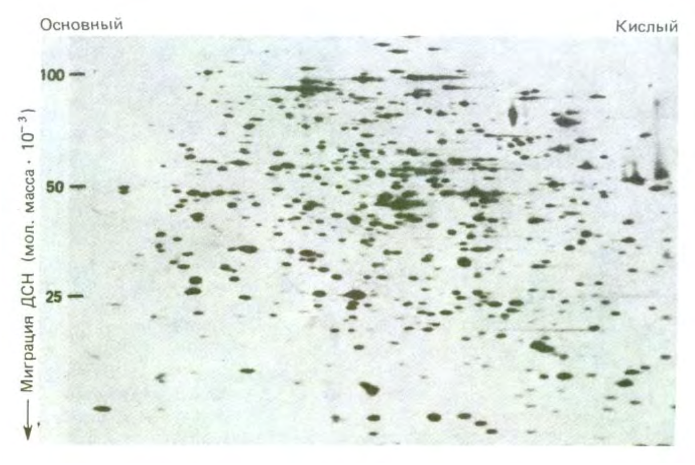


Рис. 4-52. Фракционирование белков клетки *E. coli* методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Каждое пятно соответствует отдельной полипептидной цепи. Сначала белки разделяли соответственно их изоэлектрическим точкам методом изоэлектрического фокусирования слева направо. Затем в присутствии ДСН их разделяли методом электрофореза сверху вниз в соответствии с молекулярной массой их субъединиц. Отметим, что содержание разных белков в клетке неодинаково. (С любезного разрешения Patrick O'Farrell.)

Таблица 4-9. Основные вехи в развитии методов хроматографии и электрофореза и в применении этих методов для разделения биологических макромолекул

1833 - **Фарадей** (Faradey) сформулировал фундаментальные законы, описывающие электрические явления в растворах

1850 - **Рунге** (Rounge) разделил неорганические соединения по их дифференциальной адсорбции на бумаге, предвосхитив тем самым появление методов хроматографического разделения

1906 - **Цвет** изобрел хроматографию на колонках. Он пропустил петролейные экстракты листьев растений через колонку с порошкообразным мелом

1933 - **Тизелиус** (Thiselius) использовал электрофорез для разделения белков в растворе

1942 - **Мартин и Синж** (Martin, Synge) изобрели распределительную хроматографию, на основе которой через два года был разработан метод хроматографии на бумаге

1946 - **Стайн и Мур** (Stain, Moore) впервые определили аминокислотный состав белка. Первыми в качестве наполнителя в колоночной хроматографии они использовали крахмал, а позже ионообменные смолы

1955 - **Смитис** (Smithies) для разделения белков с помощью электрофореза использовал крахмальный гель

1955 - **Сэнгер** (Sanger) завершил анализ аминокислотной последовательности бычьего инсулина. Это первый белок, у которого определена полная аминокислотная последовательность

1956 - **Ингрэм** (Ingram) получил первые пептидные карты («фингерпринты» - «отпечатки пальцев»), показав при этом, что различия гемоглобина больных серповидноклеточной анемией и нормального гемоглобина обусловлены заменой одной-единственной аминокислоты

1959 - **Рэймонд** (Raymond) ввел в лабораторную практику полиакриламидный гель, который превосходит гель из крахмала при электрофоретическом разделении белков; в течение нескольких последующих лет Орнстайн и **Дэвис** (Ornstain, Davis) разработали более эффективные буферные системы, что позволило проводить разделение белков с высокой степенью разрешения

1966 - **Мэйзел** (Mayzel) для усовершенствования разделения белков в полиакриламидном геле предложил использовать додецилсульфат натрия (ДСН-SDS)

1975 - **О'Фаррел** (O'Farrell) разработал систему двумерного гель-электрофореза для анализа белковых смесей. Предложенный им метод представляет собой сочетание ДСН-электрофореза белков в полиакриламидном геле и изоэлектрического фокусирования

1984 - **Шварц и Кантор** (Schwartz, Cantor) разработали метод электрофореза в пульсирующем электрическом поле (пульс-электрофорез), используемый для разделения очень больших молекул ДНК

рует сквозь блок геля и образует в нем отдельную полосу. Так осуществляется разделение во втором направлении двумерного гель-электрофореза. Неразделенными в результате остаются только те белки, которые неразличимы как по изоэлектрической точке, так и по молекулярной массе; такое сочетание встречается очень редко.

Используя различные методы окрашивания белков, а в случае радиоактивно меченных белков - метод радиоавтографии (см. разд. 4.5.2), можно выявить следовые количества практически всех полипептидных цепей. За один раз методом двумерного гель-электрофореза можно разделить до 2000 отдельных полипептидных цепей; этого достаточно, чтобы выявить большинство бактериальных белков (рис. 4-52). Разрешение этого метода настолько велико, что позволяет разделить два практически идентичных белка, отличающихся одной заряженной аминокислотой. Таблица 4-9 знакомит нас с основными этапами развития методов хроматографии и электрофореза.

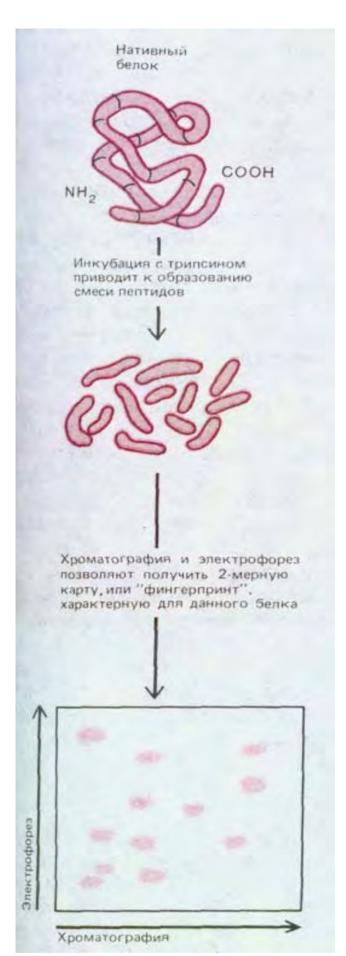


Рис. 4-53. Получение пептидной карты («фингерпринта» или «отпечатков пальцев») белков. В данном случае белок расщепляли трипсином и получили смесь мелких фрагментов полипептидов. Эту смесь фракционировали в двух направлениях: электрофорезом и распределительной хроматографией. Полученная картина пятен характеризует данный белок.

4.4.6. Избирательное расщепление белка приводит к образованию характерного набора пептидных фрагментов [29]

Молекулярная масса и изоэлектрическая точка - характерные параметры белка. Однако в основе точной идентификации белковой молекулы лежит определение аминокислотной последовательности. Уже на первом этапе этого процесса, включающего расщепление белка на мелкие фрагменты, можно получить значительную информацию о данном белке. В настоящее время в продаже имеются протеолитические ферменты и химические реактивы, расщепляющие белки по определенным аминокислотным остаткам (табл. 4-10). Так, фермент *трипсин* отщепляет остатки лизина и аргинина со стороны карбоксильных групп; химический реактив *бромистый циан* расщепляет пептидные связи, расположенные после остатков метионина. Поскольку такие специфические ферменты и реактивы расщепляют в белковой молекуле ограниченное количество связей, при их воздействии образуется смесь больших пептидов. Разделив эту смесь методом электрофореза или хроматографии, можно получить **пептидную карту,** характеризующую исследуемый белок. Такие пептидные карты называют иногда «фингерпринтами» (отпечатками пальцев) белка (рис. 4-53).

Таблица 4-10. Некоторые реактивы, используемые для расщепления пептидных связей в белках

	Аминокислота 1	Аминокислота 2
Фермент		
Трипсин	Лизин или аргинин	*Любая*
Химотрипсин	Фенилаланин, триптофан или тирозин	»
V8-Протеаза	Глутаминовая кислота	»
Химический реактив		
Бромистый циан	Метионин	»
2-Нитро-5-тиоцианобензоат	Любая	Цистеин

Указана специфичность в отношении аминокислот с каждой стороны от расщепляемой связи. После расщепления высвобождается карбоксильная группа по аминокислоте 1; эта аминокислота расположена слева от пептидной связи при нормальном написании (см. схему 2-5).

Этот метод был разработан в 1956 г. для сравнения нормального гемоглобина с мутантной формой того же белка, обнаруживаемой в крови больных *серповидноклеточной анемией.* Оказалось, что мутантный белок отличается от нормального по одной-единственной аминокислоте. Так впервые было доказано, что мутация может привести к замене в белке только одной аминокислоты.

4.4.7. С помощью автоматических приборов можно анализировать короткие аминокислотные последовательности [30]

Осуществив расщепление белка на мелкие фрагменты, приступают к следующему этапу - определяют последовательность аминокислот в каждом из выделенных пептидных фрагментов. Для этого проводят серию химических реакций, которые впервые были предложены в 1967 году. Сперва пептид обрабатывают каким-либо реактивом, взаимодействующим только со свободной аминогруппой на его N-конце. Далее этот реактив активируют, воздействуя на него слабой кислотой. Теперь он специфически расщепляет пептидную связь, соединяющую

N-концевую аминокислоту с пептидной цепью; высвобождающуяся при этом аминокислоту идентифицируют методом хроматографии. Оставшийся пептид укорачивается в результате на одну аминокислоту. Его также подвергают реакциям, проводимым в той же последовательности, - и так, пока в пептиде не будет определена каждая аминокислота.

Циклический характер этих реакций дает возможность автоматизировать весь процесс. В настоящее время выпускаются приборы **(аминокислотные секвенаторы),** производящие автоматическое определение последовательности аминокислот в пептидных фрагментах. На последнем этапе анализа последовательности аминокислот, полученные для пептидных фрагментов, располагают в том же порядке, как они были расположены в интактной цепи. Для этого сравнивают последовательности наборов перекрывающихся фрагментов, полученных при расщеплении одного и того же белка различными протеолитическими ферментами.

Усовершенствование техники секвенирования белка значительно повысило его скорость и чувствительность, позволяя анализировать минимальные количества образца. Например, в настоящее время последовательность из нескольких десятков аминокислот можно выяснить, имея в распоряжении всего несколько микрограммов белка - количество, извлекаемое из одной полосы ДСН-полиакриламидного геля. Это оказалось крайне важно для изучения многих минорных белков клетки, например, рецепторов стероидных или полипептидных гормонов. В настоящее время достаточно определить в белке 20 аминокислот, чтобы сконструировать ДНК-зонд, используемый для клонирования соответствующего гена (см. разд. 5.6.5). После выделения гена оставшаяся невыясненной часть аминокислотной последовательности белка может быть реконструирована по нуклеотидной последовательности согласно генетическому коду. Это можно считать значительным достижением, поскольку даже с полной автоматизацией определение полной первичной последовательности белка остается крайне сложной задачей. Так, например, если белок состоит из 100 аминокислот, их последовательность, если очень напряженно трудиться, можно установить за месяц. Но с удлинением цепи аминокислот сложности нарастают очень быстро, что не позволяет превратить процесс определения аминокислотной последовательности в рутинную методику. Учитывая то обстоятельство, что секвенирование ДНК - процедура более легкая и занимает меньше времени (см. ниже), в настоящее время последовательность аминокислот в большинстве белков, как правило, определяют по нуклеотидной последовательности соответствующих генов.

Заключение

Клеточные популяции можно анализировать биохимически, разрушая клетки и анализируя их содержимое с помощью ультрацентрифугирования. Дальнейшее фракционирование позволяет создать функциональные бесклеточные системы; такие системы необходимы для определения молекулярных деталей сложных клеточных процессов. Например, с помощью этого метода в недавнее время были исследованы синтез белка, репликация ДНК, сплайсинг РНК и различные типы внутриклеточного транспорта.

Мажорные белки растворимых клеточных экстрактов можно очищать с помощью колоночной хроматографии; в зависимости от типа матрикса в колонках биологически активные белки можно разделять по их молекулярной массе, гидрофобности, характерному заряду либо сродству с иными молекулами. В ходе очистки, как правило, образец пропускают через несколько колонок - обогащенные фракции, полученные

Таблица 4-11. Использование некоторых радиоактивных изотопов в биологических исследованиях

Изотоп	**Период полураспада** [1)]
^{32}P	14 сут
^{131}I	8,1 сут
^{35}S	87 сут
^{14}C	5570 лет
^{45}Ca	164 сут
^{3}H	12,3 года

[1)] Изотопы расположены в порядке уменьшения энергии испускаемых ими электронов. ^{131}I испускает также γ-лучи. *Период полураспада - время, в* течение которого распадается 50% атомов данного изотопа.

с одной колонки, наносят на следующую. После очистки белка до гомогенного состояния проводят тщательное определение его биологической активности. Можно определить также небольшой фрагмент аминокислотной последовательности белка и клонировать его ген; оставшуюся часть аминокислотной последовательности реконструируют по последовательности нуклеотидов в гене.

Даже если количество белка очень невелико, его молекулярную массу и субъединичный состав можно определить, используя ДСН-электрофорез в ПААГ. В случае двумерного электрофореза белки разделяют на отдельные фракции изоэлектрическим фокусированием в одном направлении, после чего следует ДСН-электрофорез во втором направлении. Этот метод может быть использован для разделения тех белков, которые в норме считаются нерастворимыми.

4.5. Изучение клеточных макромолекул с помощью антител и радиоактивных изотопов

Для изучения клеточных макромолекул можно использовать практически все свойства молекул - физические, химические и биологические. При биологическом исследовании молекулы внутри клеток выявляют обычно по оптическим свойствам (в чистом виде или в комплексе с красителями), а также по биохимической активности. Здесь мы рассмотрим два метода определения молекул внутри клеток: один из них включает использование радиоактивных изотопов, а другой - использование антител. Оба метода весьма эффективны для выявления определенных молекул в сложных смесях. Потенциально эти методы очень чувствительны и при оптимальных условиях дают возможность обнаруживать в образце молекулы, общее количество которых меньше 1000.

4.5.1. Методы выявления радиоактивных атомов отличаются высокой чувствительностью [31]

Большинство известных природных элементов представляют собой смесь *изотопов,* различающихся массой атомного ядра, но имеющих, тем не менее, одинаковый набор электронов, а, следовательно, одинаковые химические свойства. Ядра **радиоактивных изотопов,** или **радиоизотопов,** нестабильны и подвергаются спонтанному распаду, образуя различные атомы. При распаде ядра испускаются заряженные частицы (например, электроны) или излучение (например, гамма-лучи).

Вследствие своей нестабильности в природе радиоизотопы встречаются редко, но в ядерных реакторах, где стабильные атомы подвергаются бомбардировке частицами высокой энергии, их образуется чрезвычайно много (табл. 4-11). В настоящее время многие биологические молекулы стали доступны в форме, содержащей радиоактивные атомы. Для регистрации излучения, испускаемого радиоактивными изотопами, используют различные подходы. Электроны (β-частицы) можно определять по ионизации газа, которую они вызывают в *счетчике Гейгера,* или в *сцинтилляционном счетчике* по маленьким вспышкам света в сцинтилляционной жидкости. С помощью этих методов в биологическом образце можно выявить содержание определенного радиоактивного изотопа. Наличие радиоактивных изотопов в образце регистрируют и методом радиоавтографии (по их действию на зерна серебра в фотоэмульсии). Данный метод характеризуется очень высокой чувствительностью, и в благоприятных условиях с его помощью можно зарегистрировать практически каждый распад, т. е. может быть учтен практически каждый радиоактивный атом.

4.5.2. Радиоактивные изотопы используют для изучения перемещения молекул в клетках и в целом организме [32]

Один из первых примеров использования феномена радиоактивности в биологических исследованиях - изучение превращения углерода в процессе фотосинтеза. Одноклеточные зеленые водоросли поместили в атмосферу, содержащую радиоактивно меченный CO_2 ($^{14}CO_2$), и облучали в разные промежутки времени солнечным светом. Затем радиоактивное содержимое водорослей фракционировали с помощью хроматографии на бумаге. Небольшие молекулы, содержащие атомы ^{14}C, происходящие из молекул CO_2, выявляли на хроматограмме, помещая поверх высушенной бумажной хроматограммы лист фотопленки. Таким образом было идентифицировано большинство основных компонентов, образующихся в процессе фотосинтеза Сахаров из CO_2.

Радиоактивные молекулы можно использовать для исследования практически всех внутриклеточных процессов. Для этого обычно в ходе эксперимента в культуральную среду добавляют предшественник в радиоактивной форме: при этом радиоактивные молекулы смешиваются с присутствующими в клетках нерадиоактивными. Клетка использует оба типа молекул, поскольку они отличаются только массой атомного ядра. Изменение локализации радиоактивных молекул в клетке или их химические превращения можно проследить во времени. Чувствительность таких экспериментов во многих случаях повышают, используя метод **вытеснения метки** (pulse-chase). При использовании этого метода радиоактивные вещества добавляют на очень короткое время *(импульсная метка),* затем их удаляют и замещают нерадиоактивными молекулами. Образцы отбирают через различные промежутки времени и в каждой такой точке определяют химическую природу и локализацию химических веществ (рис. 4-54).

Значение метода радиоактивного мечения трудно переоценить. Именно этот метод дает возможность дискриминировать химически идентичные молекулы, история которых различна - например, те молекулы, которые отличаются временем синтеза. С помощью радиоактивных методов удалось определить, что почти все молекулы живой клетки постоянно разрушаются и замещаются другими молекулами. Такие медленные обменные процессы могли бы остаться незамеченными, если бы не радиоактивные изотопы.

В настоящее время промышленность производит в радиоактивной форме практически все распространенные низкомолекулярные вещества. Независимо от степени сложности биологических молекул почти каждую из них можно пометить радиоактивной меткой. Часто получают радиоактивные молекулы, в структуру которых радиоактивные атомы введены в определенных положениях. Это делают для того, чтобы получить возможность следить за независимыми превращениями, претерпеваемыми различными частями одной молекулы в ходе биологических реакций (рис. 4-55).

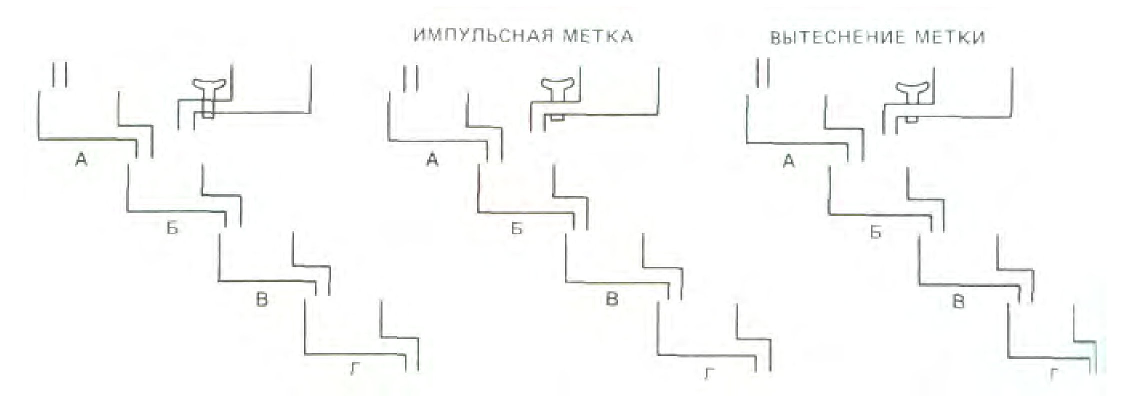


Рис. 4-54. Схема, иллюстрирующая суть типичного эксперимента с вытеснением импульсной метки. Буквами А, Б, и В помечены резервуары, которые соответствуют различным компартментам клетки (выявляемым с помощью радиоавтографии или в опытах, включающих фракционирование клетки) или различным химическим соединениям (выявляемым хроматографически или с помощью каких-либо иных химических методов).

Рис. 4-55. Три радиоактивные формы АТР, имеющиеся в продаже. Радиоактивные атомы выделены цветом. Приведены обозначения, с помощью которых указывается расположение и тип радиоактивных атомов.

Одна из наиболее важных областей применения радиоактивных изотопов в биологии клетки - это определение локализации радиоактивных соединений в срезах клеток или живых тканей методом **радиоавтографии.** При использовании этого метода живые клетки подвергают кратковременному (импульсному) мечению с последующей инкубацией в течение различных промежутков времени в нерадиоактивной среде. Затем клетки фиксируют и обрабатывают для проведения световой или электронной микроскопии. Каждый приготовленный препарат покрывают тонким слоем фотоэмульсии и оставляют на несколько дней в темноте - время, в течение которого происходит распад радиоактивного изотопа. Затем фотоэмульсию проявляют. Местоположение радиоактивных молекул в каждой клетке можно определить по расположению темных зерен серебра. Если инкубировать клетки с радиоактивным предшественником ДНК (^{3} *Н-тимидином),* то можно увидеть, что ДНК синтезируется в ядре и там же остается. И наоборот, мечение клеток радиоактивным предшественником РНК (^{3}*Н-уридином)* показывает, что РНК исходно синтезируется в ядре и затем быстро накапливается в цитоплазме клеток.

4.5.3. Для выявления и выделения специфических молекул можно использовать антитела [33]

Антителами называют белки, продуцируемые позвоночными животными для защиты от инфекции (см. гл. 18). Количество различных форм

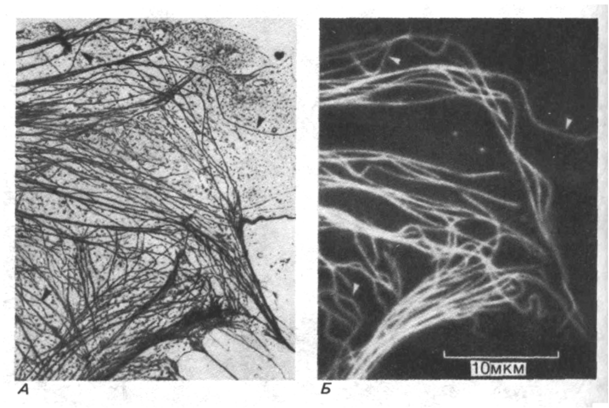


Рис. 4-56. *А.* На электронной микрофотографии периферического участка эпителиальной клетки в культуре можно различить расположение микротрубочек и других филаментов. *Б. С* помощью метода непрямой иммуноцитохимии тот же участок окрашен флуоресцирующими антителами к тубулину, который является мономером микротрубочек (см. рис. 4-58). Стрелками указаны отдельные микротрубочки, хорошо различимые на обеих микрофотографиях (Osborn M., Webster R., Weber K., J. Cell Biol., 77, R27-R34, 1978, воспроизводится с разрешения Rockefeller University Press.)

антител достигает миллиона; этим антитела и отличаются от прочих белков. Каждая форма антител обладает определенными участками связывания, которые предназначены для специфического узнавания молекул, стимулировавших синтез антител. Эти молекулы называют *антигенами.* Высокая специфичность антител в отношении антигена превращает их в мощный инструмент для исследования биологии клетки. После окрашивания антител флуоресцирующими красителями их можно использовать для определения внутриклеточной локализации специфических макромолекул с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 4-56). Мечение электроноплотными микрочастицами, например, микросферами коллоидного золота, позволяет использовать антитела для локализации клеточных антигенов при помощи электронной микроскопии (рис. 4-57). Антитела могут выступать в роли биохимических звеньев для выявления и определения количества молекул в клеточных экстрактах и идентификации специфических белков после их разделения с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. При связывании антител с инертным матриксом получают аффинные колонки, пригодные для выделения и очистки специфических молекул из грубых клеточных экстрактов. Чувствительность антител, используемых в качестве зонда для выявления специфических макромолекул в клетках и тканях, часто увеличивают с помощью метода усиления сигнала. Например, такую маркерную молекулу как флуоресцирующий краситель можно прямо связывать с антителами и использовать для непосредственного определения антигена *(первые антитела).* Еще большего усиления сигнала можно добиться, применяя немеченые первые антитела и затем выявляя их с помощью меченых *вторых антител,* связывающихся с первыми антителами (рис. 4-58, *А).*

Еще одна система усиления сигнала основана на исключительно высоком сродстве *биотина* (низкомолекулярного растворимого витамина) к *стрептавидину* (бактериальному белку). При ковалентном связывании первых антител с биотипом можно прямо пометить стрептавидин маркером и использовать его вместо вторых антител. Стрептавидин также можно применять для связывания отдельных молекул антител, меченных биотином, с разветвленной сетью молекул, меченных биотином (рис. 4-58, *Б).* Такие сети получают вследствие модификации метода (рис. 4-58, *А)* за счет применения третьего слоя антител.

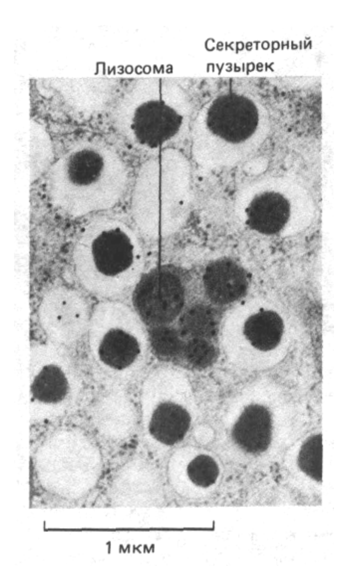


Рис. 4-57. Иммуноцитохимическая локализация специфических белковых молекул на электронных микрофотографиях с помощью мечения антителами, связанными с частицами коллоидного золота. Показан тонкий срез клетки, секретирующей инсулин, где молекулы инсулина помечены антиинсулиновыми антителами, связанными с мельчайшими микросферами золота (каждая в виде черной точки). Большая часть инсулина накапливается в плотном содержимом секреторных гранул; кроме того, содержимое некоторых секреторных гранул деградирует в лизосомах. (L. Orri, Diabetology, 28, 528-546,1985.)

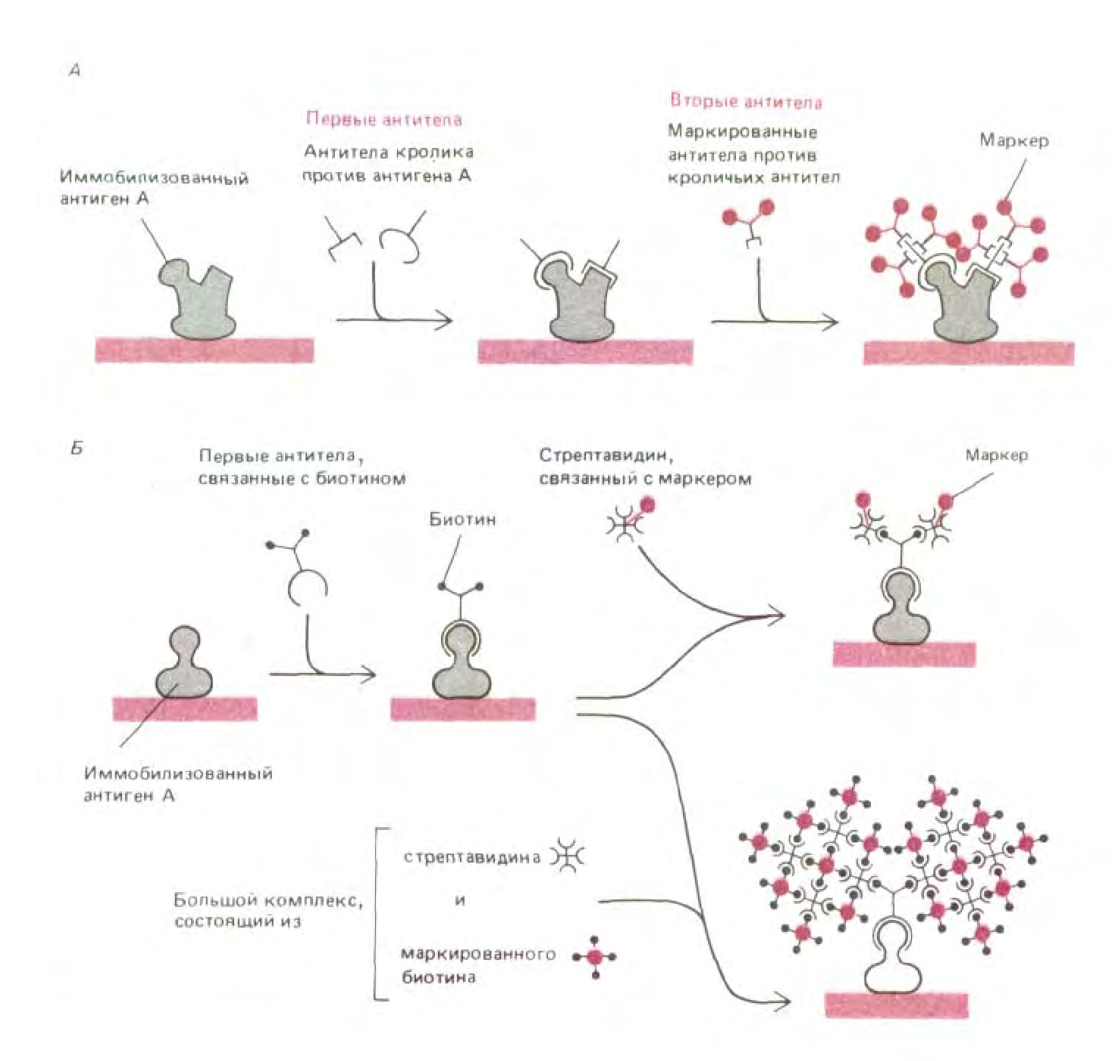


Рис. 4-58. Применение антител для выявления определенных молекул с высокой чувствительностью. *А.* Иллюстрация метода непрямой иммуноцитохимии, высокая чувствительность которого определяется тем, что первое антитело (так называют молекулу антитела непосредственно связывающуюся с узнаваемой молекулой антигена) опознается многими молекулами антител второго типа. Эти вторые антитела предварительно связаны с маркерными молекулами, что и позволяет их регистрировать. В качестве маркерных молекул используют красители флуоресцеин и родамин (для флуоресцентной микроскопии), фермент щелочную пероксидазу (для электронной и светлопольной микроскопии), белок ферритин, содержащий железо, или микросферы коллоидного золота (для электронной микроскопии) и фермент щелочную фосфатазу (для биохимической детекции). *Б.* Модификация метода, представленного на *А:* вместо вторых антител используют взаимодействие биотина и стрептавидина, характеризуемое высоким сродством. Поскольку каждая из молекул стрептавидина может связать четыре молекулы биотина, она соединяет множество биотинилированных маркерных молекул поперечными сшивками с образованием громадной трехмерной сети. Внизу представлен особенно чувствительный метод «сандвича», где такие сети используются для интенсивного мечения каждой из молекул первых антител.

В наиболее чувствительных методах усиления сигнала в качестве маркерной молекулы используется фермент. Например, щелочная фосфатаза участвует в реакции образования неорганического фосфата, и поэтому связывание фермента со вторым антителом позволяет использовать чувствительный химический тест на фосфат для выявления комплекса антитело - антиген. Поскольку такая ферментная молекула вследствие своих каталитических свойств образует многие тысячи молекул продукта реакции, метод *иммунодетекции с применением связанной формы фермента* (Enzyme-Linked Immunoassay - ELISA) дает возможность обнаружить минимальное количество антигена. Данный метод хорошо зарекомендовал себя в клинической медицине для диагностики различных типов инфекций.

Обычно антитела извлекают из сыворотки, обогащенной антителами, которую получают путем многократного введения антигена животным (например, кролику или козе). Эта *антисыворотка* содержит гетерогенную смесь антител, каждый тип которых был образован определенными клетками, синтезирующими антитела (В-лимфоцитами). Различные антитела опознают различные части молекулы антигена, а также примеси в препарате антигена. Иногда специфичность антисыворотки к различным антигенам можно повысить, удалив молекулы нежелательных антител, которые связываются другими молекулами. Например, антисыворотку, полученную к белку X, можно пропустить через аффинную колонку с антигенами Y и Z и удалить таким образом все загрязняющие анти-Y и анти-Z антитела. Однако даже в этом случае сыворотка гетерогенна, что ограничивает ее применение.

4.5.4. Клеточные линии гибридом служат источником моноклональных антител [34]

Проблему гетерогенности антисыворотки удалось преодолеть в 1976 г. после разработки нового метода, который произвел революцию в исследовании внутриклеточных процессов с помощью антител. Этот метод включает клонирование В-лимфоцитов, секретирующих только один определенный тип антител, что обеспечивает получение однородных антител в большом количестве. Время жизни В-лимфоцитов в культуре обычно весьма ограничено. Поэтому от иммунизированных мышей получают В-лимфоциты, секретирующие отдельные виды антител, и осуществляют их слияние с «бессмертными» клетками из опухоли В-лимфоцитарного происхождения. В результате образуется гетерогенная смесь гибридных клеток, из которых отбирают гибриды, способные размножаться в культуре и синтезировать антитела определенного вида. Эти так называемые **гибридомы** клонируют по отдельности и получают клоны, каждый из которых является постоянным источником **моноклональных антител** одного типа (рис. 4-59).

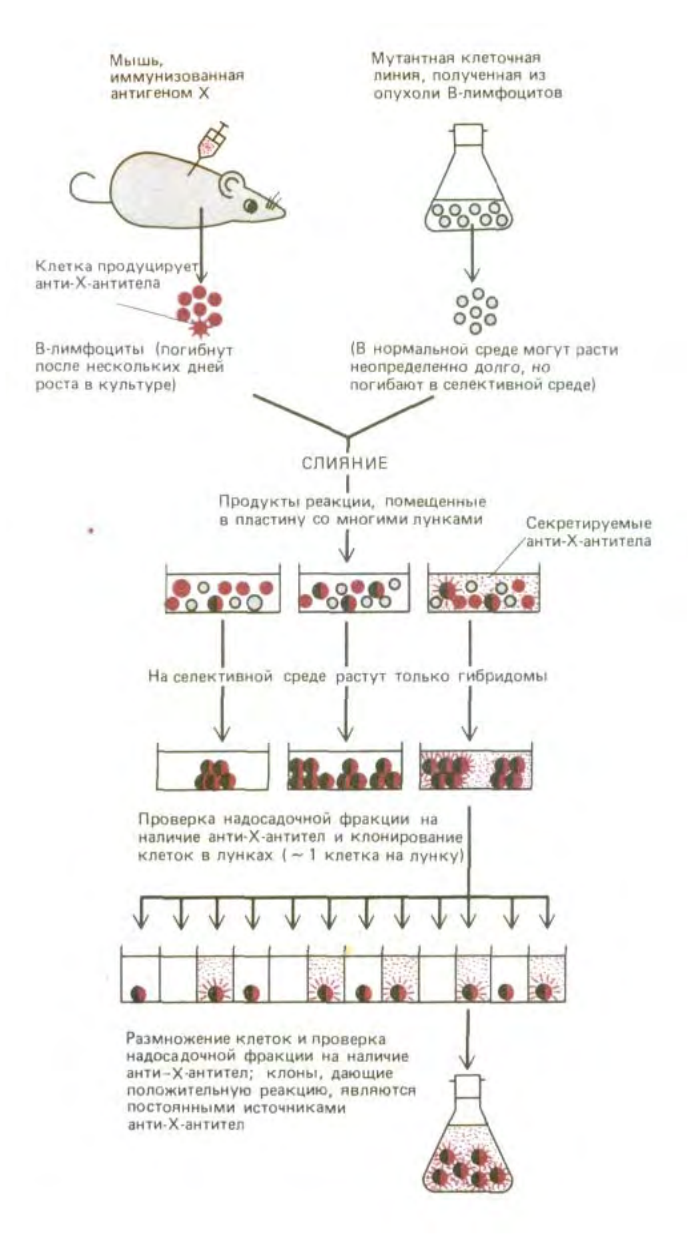


Рис. 4-59. Схема получения гибридных клеток, или «гибридом», синтезирующих гомогенные моноклональные антитела против определенного антигена (X). Использованная для роста клеток селективная среда содержит ингибитор (аминоптерин), блокирующий нормальные пути биосинтеза нуклеотидов. Поэтому для синтеза нуклеиновых кислот клеткам приходится использовать обходной путь (шунт) биосинтеза. Но именно этот шунт нарушен у мутантных клеток, использованных для слияния с нормальными В-лимфоцитами. Поскольку ни одна из взятых для опыта клеточных линий в этой среде размножаться не может, в ней выживают только гибридные клетки.

Моноклональные антитела продуцируются В-лимфоцитами одного клона, т.е. клетками, ведущими свое начало от одной-единственной клетки. Поэтому все молекулы антител данного вида обладают одинаковой специфичностью связывания антигенов. Один такой участок может опознавать, например, определенную конформацию отдельной группы из 5-6 аминокислот боковой цепи белковой молекулы и такое же количество остатков Сахаров в полисахариде. Благодаря своей строгой специфичности моноклональные антитела имеют значительное преимущество по сравнению с обычной антисывороткой, которая, как правило, содержит антитела, опознающие множество различных участков-антигенов даже в сравнительно небольшой макромолекуле.

Основное преимущество метода гибридом определяется возможностью получения моноклональных антител против неочищенных молекул, содержащихся в сложной смеси в качестве минорного компонента. Это преимущество обеспечивается реальностью выбора индивидуальных гибридом, образующих антитела определенного вида, из сложной смеси различных гибридных клеток, продуцирующих множество разных антител. Таким образом в принципе можно получить моноклональные антитела против любого белка, содержащегося в клетке. Каждый тип антител можно затем использовать в качестве специфического зонда как для локализации белков с помощью цитологических методов, так и для очистки белков. Получив белки в чистом виде, мы можем исследовать их структуру и функцию. К настоящему времени выделено не более 5% из 1000 или более различных белков, которые, судя по имеющимся данным, содержатся в типичной клетке млекопитающих. Использование моноклональных антител и технологии клонирования генов (см. ниже) снимает многие сложности в идентификации и определении новых белков и генов. Проблемой для исследователей остается определение их функций.

4.5.5. Антитела и другие макромолекулы можно инъецировать в живые клетки [35]

Молекулы антител можно использовать для определения функции тех молекул, с которыми они связываются. Например, у новорожденных крыс, получивших антитела к белковому фактору, который стимулирует рост нейронов, не развиваются нервные клетки определенного типа, нуждающиеся для выживания в данном факторе роста. Подобным образом антитела, реагирующие с молекулами на поверхности некоторых типов клеток, можно использовать для уничтожения этих клеток; специфически удаляя клетки определенного типа из смешанной клеточной популяции, можно определить важность клеток этого типа для осуществления различных биологических функций.

Поскольку плазматическая мембрана клеток непроницаема для крупных молекул, белки, расположенные внутри живых клеток, не могут взаимодействовать с антителами, добавляемыми извне. Если такие белки необходимо связать, в цитоплазму клеток эукариот можно ввести антитела и другие молекулы, инъецируя их тонкой стеклянной пипеткой через плазматическую мембрану. Прокалываемая плазматическая мембрана имеет способность «самозапаиваться» спустя некоторое время после инъекции. С помощью этого метода было установлено, что при введении в оплодотворенное яйцо морского ежа антител к миозину, его деление останавливается, хотя деление ядер происходит нормально. Отсюда следует, что миозин выполняет ключевую роль в процессах сокращения, обеспечивающих деление цитоплазмы при митозе, но не принимает участия в работе митотического веретена. Моноклональные антитела

обладают высокой специфичностью, их нетрудно получить в концентрированной форме, и поэтому они особенно удобны для проведения таких исследований.

Заключение

В клетке можно пометить любые молекулы: для этого в них вводят один или несколько радиоактивных атомов. Нестабильные радиоактивные атомы распадаются, испуская излучение, что позволяет прослеживать судьбу исследуемых молекул. Применение радиоизотопов в клеточной биологии ограничено двумя видами экспериментов: анализ метаболических путей по методу вытеснения метки и локализацией меченых молекул в клетке с помощью радиоавтографии. Антитела представляют собой очень удобный и чувствительный инструмент для локализации специфических биологических макромолекул. В организме позвоночных животных продуцируются миллионы различных антител, в каждом из которых имеются участки связывания, опознающие специфические группы молекул. Метод гибридом позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью практически в неограниченных количествах. В принципе можно получать моноклональные антитела против любых макромолекул в клетке и затем использовать эти антитела для локализации или очистки определенных макромолекул, а в некоторых случаях и для анализа внутриклеточных свойств этих молекул.

4.6. Технология рекомбинантных ДНК [36]

Основная проблема молекулярной биологии на сегодняшний день состоит в том, чтобы разобраться в тонких механизмах клеточных процессов. Мы обсудили несколько чувствительных методов очистки, анализа белков и слежения за ними в клетках. Этот последний раздел посвящен методам изучения структуры и функции клеточных ДНК. Классический подход подразумевает использование генетических методов, позволяющих судить о функции генов, анализируя фенотипы мутантных организмов и их потомства. Этот подход по-прежнему эффективен, но в последнее время он дополнен набором методов, которые в сумме известны как «технология рекомбинантных ДНК». Эти методы существенно расширили возможности генетических исследований, поскольку с их помощью удается проводить как прямой контроль, так и детальный химический анализ генетического материала. Используя методологию рекомбинантных ДНК, удается даже минорные клеточные белки получать в больших количествах и, следовательно, проводить тонкие биохимические исследования структуры и функции белка.

4.6.1. Технология рекомбинантных ДНК революционизировала клеточную биологию [37]

Еще не так давно, всего лишь в начале 70-х годов биохимики считали, что ДНК является наиболее сложным для исследования компонентом клетки. Чрезвычайно длинную, химически монотонную последовательность нуклеотидов в наследственном материале тогда можно было исследовать лишь с помощью косвенных методов - либо определяя структуру белка или РНК, либо с помощью генетического анализа. В настоящее время ситуация крайне изменилась. Если ранее анализ ДНК представлялся исследователям структуры биологических молекул крайне трудной задачей, то теперь, когда были разработаны новые методы анализа первичной структуры ДНК, такой анализ не составляет особого

труда. В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать их практически в неограниченном количестве и определять последовательность нуклеотидов по нескольку сот нуклеотидов в день.

С помощью этих же методов можно по желанию экспериментатора изменить выделенный ген и ввести его вновь в геном культивируемых клеток или эмбрион животного (что несколько более сложно), где этот измененный ген начинает функционировать.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя исследователям решать задачи, которые раньше казались неразрешимыми, например определять функции многих вновь открытых белков и их индивидуальных доменов, расшифровывать сложные механизмы регуляции экспрессии генов у эукариот. С помощью методов генной инженерии удалось в большом количестве получить многие белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации и развитии. Применение этих методов должно принести успех в крупномасштабном промышленном производстве белковых гормонов и искусственных вакцин, на получение которых ранее затрачивали очень много сил и средств.

Технология рекомбинантных ДНК включает в себя набор методов - как новых, так и заимствованных из других дисциплин, например из генетики микроорганизмов (табл. 4-12). Наиболее важные среди них это:

1) специфическое расщепление ДНК *рестрицирующими нуклеазами,* что существенно ускоряет выделение и манипуляции с различными генами;

2) быстрое *секвенирование* всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им; 3) *гибридизация нуклеиновых кислот,* позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большой точностью и чувствительностью на основании их способности связывать комплементарные последовательности нуклеи-

Таблица 4-12. Основные вехи в развитии технологии рекомбинантных ДНК

1869 -	Мишер (Miesher) впервые выделил ДНК
1944 -	Эвери (Avery) установил, что ДНК, а не белок, переносит генетическую информацию при трансформации бактерий
1953-	Уотсон и Крик (Watson, Crick) предложили модель двойной спирали ДНК, основанную на результатах рентгеноструктурного анализа, проведенного Франклин и Уилкинсом (Franklin, Wilkins)
1961 -	Мармур и Доти (Marmur, Doty) открыли явление ренатурации ДНК, установив точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот
1962 -	Арбер (Arber) впервые получил данные о существовании ферментов рестрикции ДНК, впоследствии выделенных и использованных для определения последовательности ДНК Натансом и Смитом (Nathans, Smith)
1966 -	Ниренберг, Очоа и Корана (Nirenberg, Ochoa, Khorana) расшифровали генетический код
1967 -	Геллерт (Gellert) открыл ДНК- лигазу - фермент, используемый для сшивания фрагментов ДНК
1972-73 -	В лабораториях Бойера, Коэна и Берга (Boyer, Cohen, Berg) и их коллег в Станфордском университете и в Калифорнийском университете в Сан-Франциско была разработана технология клонирования ДНК
1975-77 -	Сэнгер и Баррел (Sanger, Barrel), а также Максам и Гилберт (Maxam, Gilbert) разработали методы быстрого определения нуклеотидной последовательности
1981-82 -	Пальмитер и Бринстер (Palmiter, Brinster) получили трансгенную мышь; Спрэдлинг и Рубин (Spradling, Rubin) получили трансгенные экземпляры дрозофилы

новых кислот; 4) *клонирование ДНК:* интересующий исследователя ДНК-фрагмент вводят в самореплицирующийся генетический элемент (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации воспроизводит этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий; 5) *генетическая инженерия,* посредством которой последовательности ДНК изменяют с целью создания модифицированных версий генов, которые затем вновь внедряют в клетки или организмы.

Для того чтобы разобраться в технологии рекомбинантных ДНК, необходимо очень хорошо понимать природные механизмы, используемые клетками для репликации и расшифровки ДНК. Мы поэтому отложим детальное обсуждение клонирования генов и генетической инженерии. В гл. 5 эти вопросы будут разобраны после знакомства читателей с основными генетическими механизмами.

4.6.2. Рестрицирующие нуклеазы расщепляют ДНК в специфических участках нуклеотидных последовательностей [38]

Для защиты от молекул чужеродных ДНК, способных проникнуть в клетку и вызвать ее трансформацию, многие бактерии вырабатывают ферменты **рестрицирующие нуклеазы,** способные разрушить чужеродную ДНК. Каждый такой фермент опознает в ДНК специфическую последовательность из 4-6 нуклеотидов. Соответствующие последовательности в геноме самих бактерий замаскированы метилированием остатков А и С, но любая чужеродная молекула ДНК, попав в клетку, немедленно опознается нуклеазой, и обе цепи ее ДНК разрезаются (рис. 4-60). Из различных видов бактерий было выделено множество рестрицирующих нуклеаз. В настоящее время различными фирмами производится более 100 таких ферментов, большинство из которых опознает различные последовательности нуклеотидов.

Индивидуальная рестрицирующая нуклеаза способна разрезать двойную спираль ДНК любой длины с образованием серии фрагментов, называемых *рестрикционными фрагментами* (рестриктами). Сравнение размеров фрагментов ДНК, полученных после обработки определенного участка генома набором рестрицирующих нуклеаз, позволяет построить *рестрикционную карту,* на которой указано положение каждого сайта рестрикции относительно других рестрикционных участков (рис. 4-61) Поскольку рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет приближенно оценить гомологию между ними. Отсюда следует, что можно проводить сравнение различных участков ДНК (сравнивая их рестрикционные

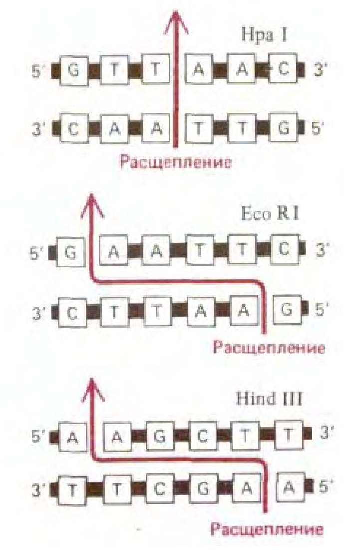


Рис. 4-60. Последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая тремя широко используемыми рестрицирующими нуклеазами (участки узнавания). Такие последовательности часто содержат шесть нуклеотидов и являются «палиндромными», т. е. последовательности нуклеотидов в них в обоих направлениях читаются одинаково. Две цепи ДНК разрезаются в участке узнавания или вблизи от него, причем во многих случаях разрез проходит через обе цепи не перпендикулярно, т. е. в одном месте, а наискосок, образуя в результате липкие концы, например *Eco* R1 или *Hind* III. Рестрицирующие нуклеазы получают из различных бактерий: *HpaI* - из *Haemophilus parainfluenzae, Eco* Rl - из *Escherichia coli, Hind* III - из *Haemophilus influenzae.*

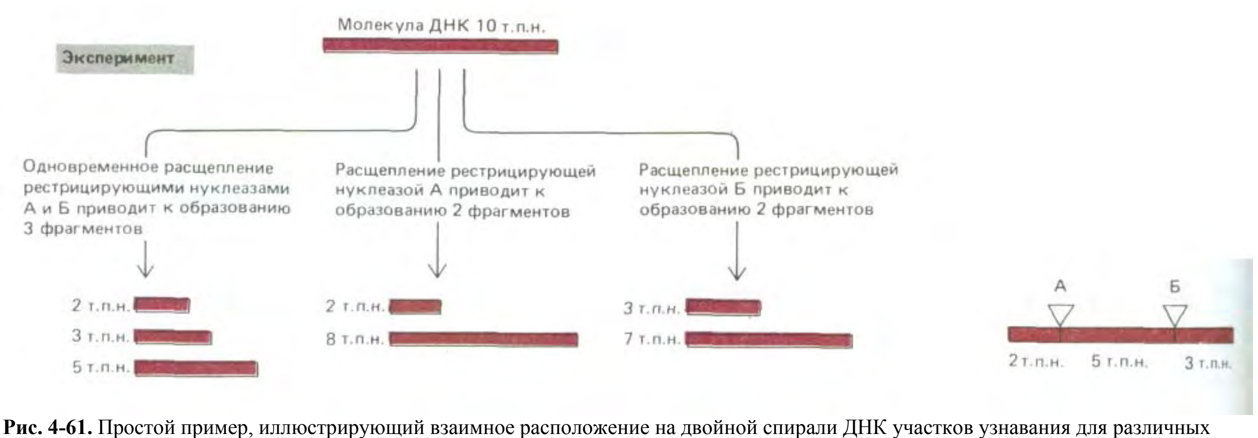


Рис. 4-61. Простой пример, иллюстрирующий взаимное расположение на двойной спирали ДНК участков узнавания для различных рестрицирующих нуклеаз (именуемых также «сайтами рестрикции»), совокупность которых образует рестрикционную карту.

Заключение: фермент А расщепляет вблизи одного из концов молекулы. Фермент Б должен расщеплять вблизи того же конца либо вблизи другого конца. Размеры фрагментов, образующихся при расщеплении 2 ферментами исключают первое предположение и позволяют установить порядок сайтов рестрикции, указанный ниже

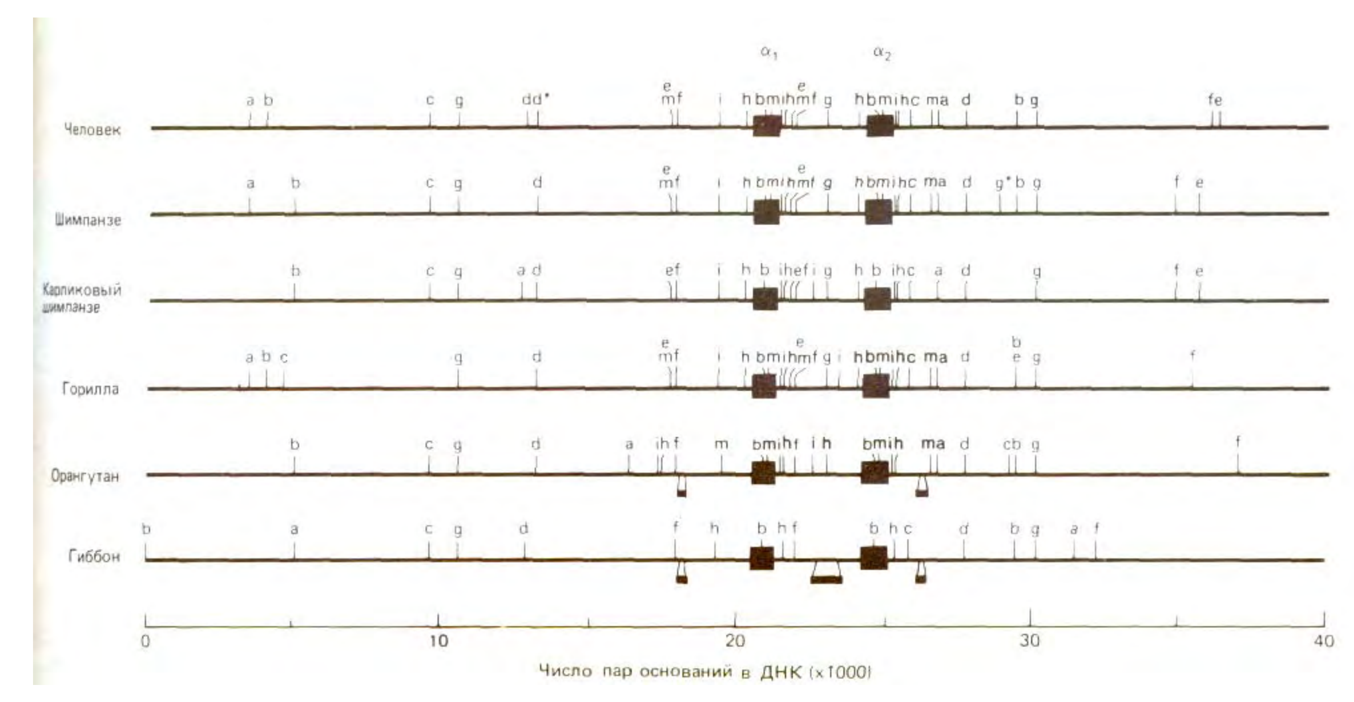


Рис. 4-62. Рестрикционная карта в кластере генов, кодирующих гемоглобин человека и различных приматов. Два окрашенных квадрата в каждой карте показывают положение участка, соответствующего гену глобина. Каждая буква указывает участок, расщепляемый различными рестрицирующими нуклеазами. Положение сайтов разреза определяли сравнением размеров фрагментов ДНК, образующихся при обработке ДНК различными рестрицирующими нуклеазами в отдельности и в различных сочетаниях. (С любезного разрешения Elisabeth Zimmer, Alan Wilson.)

карты) без определения их нуклеотидной последовательности. Например, сравнение рестрикционных карт, указанных на рис. 4-62, привело к выводу, что хромосомные участки, кодирующие цепи глобина у человека, орангутана и шимпанзе, сохранились практически в неизменном виде в течение последних 5-10 млн. лет, т.е. с тех пор, как эти виды дивергировали. Рестрикционные карты также важны для клонирования ДНК и генной инженерии; они позволяют локализовать ген на данном рестрикционном фрагменте. Объяснение этому вы найдете ниже.

4.6.3. Клонирование ДНК позволяет получать любые последовательности ДНК в большом количестве [39]

Многие рестрицирующие нуклеазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов, так что на концах фрагментов образуются короткие одноцепочечные участки. Эти одноцепочечные концевые участки обладают способностью образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента, и потому их называют *липкими концами* (рис. 4-63). Липкие концы, образованные рестрикционными ферментами, позволяют легко соединить два любых фрагмента ДНК воедино при условии, что эти фрагменты образовались после действия одной и той же рестрицирующей нуклеазы (рестриктазы) (либо иной нуклеазы, которая создает такие же липкие концы). Таким образом, фрагмент ДНК любого происхождения можно встроить в очищенную ДНК автореплицирующегося генетического элемента, которым, как правило, является плазмида или бактериальный вирус. Бактериальный клон, содержащий такую плазмиду или вирус, можно сравнить с фабрикой по производству этого фрагмента ДНК. Исходный фрагмент может происходить прямо из геномной ДНК, или из кДНК (комплементарной ДНК), т. е. из ДНК, полученной копированием матричной РНК. Эти методы детально обсуждаются в гл. 5.

Первый этап получения **клонов геномной ДНК** обычно включает выделение ДНК и ее расщепление рестриктазой. При этом возникает громадное количество различных фрагментов ДНК, например, в случае

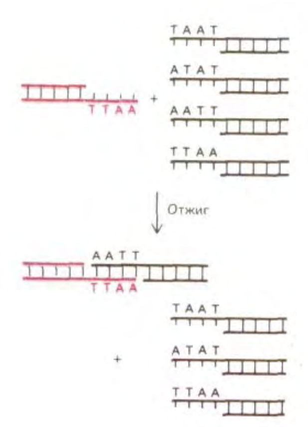


Рис. 4-63. Многие виды рестрицирующих нуклеаз позволяют получать фрагменты ДНК с липкими (одноцепочечными) концами. Фрагменты ДНК, обладающие такими концами, соединяются с помощью комплементарного взаимодействия пар оснований в области липких концов, как показано на схеме. Два фрагмента ДНК, объединяющиеся здесь, были получены с помощью рестрицирующей нуклеазы *Eco* R1 (см. рис. 4-60).

генома млекопитающих образуется от 10^5 до 10^7 фрагментов. В процессе клонирования исследователь получает миллионы клеточных колоний (клонов), большая часть которых содержит различные фрагменты ДНК. Наиболее сложным этапом клонирования является выявление именно того клона, который содержит нужный фрагмент ДНК.

Получение **клонов кДНК** начинается с выделения мРНК из клеток, Эта мРНК затем используется в качестве матрицы для обратной транскриптазы, фермента, синтезируемого определенными вирусами, ДНК которых возникает в процессе копирования последовательности РНК (процесс обратный по сравнению с обычным процессом копирования, в котором РНК синтезируется с ДНК-матрицы). Фермент создает ДНК-копию (кДНК) каждой из представленных молекул РНК. Эти одноцепочечные молекулы ДНК затем превращаются в двухцепочечные (см. разд. 5.6.3). Их клонируют с помощью методов, подобных тем, что были использованы для клонирования фрагментов геномной ДНК.

Следует иметь в виду, что существует принципиальное различие между геномными и кДНК-клонами, которое объясняется, в частности, характерным для высших эукариот процессом сплайсинга (см. разд. 9.4.8). По всей вероятности, именно клоны кДНК содержат непрерывные участки нуклеотидной последовательности, кодирующей белки.

4.6.4. Метод гель-электрофореза позволяет быстро фракционировать молекулы ДНК разного размера [40]

В начале 70-х годов было показано, что с помощью методов гель-электрофореза, которые оказались столь полезными для анализа белковых цепей, можно точно определить длину и чистоту молекул ДНК. Этот метод гораздо проще, чем модификация, используемая для белков;



Рис. 4-64. Гель-электрофорез является мощным методом разделения молекул ДНК по их размерам. В трех указанных примерах электрофорез проводили сверху вниз, так что более крупные молекулы ДНК находятся в верхней части геля. *А.* Мелкопористый полиакриламидный гель был использован для фракционирования отдельных цепей ДНК. В диапазоне размеров от 10 до 500 нуклеотидов можно делить молекулы ДНК, отличающиеся лишь одним нуклеотидом. В этом случае на дорожки 1-4 нанесены продукты четырех независимых реакций секвенирования ДНК, где на концах цепи присутствуют дидезоксирибонуклеотиды G, A, T и C (в скобках см. рис. 4-68); так как в этих реакциях используют молекулы ДНК, предварительно меченные радиоизотопами, расположение этих радиоизотопов можно выявить радиоавтографически, как указано на рисунке. *Б.* Среднепористый агарозный гель используется для разделения двухцепочечных молекул ДНК. Этот метод наиболее удобен для разделения молекул длиной от 300 до 5000 пар нуклеотидов. Именно такую длину имеет рестрикционные фрагменты бактериофага, выявляемые по флуоресценции после окраски бромистым этидием. *В.* Метод пульс-электрофореза в агарозном геле использован для разделения 16 различных хромосом дрожжей *(Saccharomyces cerevisiae),* размеры которых варьируют от 220000 до 2500000 пар нуклеотидов. В этих гелях можно разделять молекулы длиной до 107 пар нуклеотидов. *(А - с* разрешения Linder Laufer, Peter Walter; *Б - с* разрешения Ken Kreutzer, *В - с* разрешения D. Wolrath, A.W. Davies - Nucl. Acid Res., 15, 7876, 1988.)

каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты уже обладает отрицательным зарядом, и поэтому нет необходимости добавлять отрицательно заряженный детергент ДСН, который «заставляет» белковые молекулы двигаться к положительному электроду. Были разработаны специальные полиакриламидные гели, с помощью которых удается разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся даже на один нуклеотид (рис. *4-64, А).* К сожалению, поры в полиакриламидном геле для больших ДНК слишком малы, для их разделения по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарид, выделяемый из морских водорослей) (рис. *4-64, Б).* Оба этих метода разделения ДНК широко используются для аналитических и препаративных целей.

Недавно была предложена модификация гель-электрофореза в агарозном геле, названная электрофорез в пульсирующем электрическом поле или *пульс-электрофорез. С* ее помощью удается разделять очень большие, можно сказать громадные молекулы ДНК. Обычный гель-электрофорез не позволяет разделить такие молекулы ввиду постоянства электрического поля, которое придает молекулам змеевидную конфигурацию. Обладающие такой конфигурацией молекулы движутся в гелях с постоянной скоростью вне зависимости от длины молекул. Если же направление электрического поля будет часто меняться, скорость движения молекул будет определяться их способностью переориентироваться согласно этому изменению. Такой процесс у больших молекул занимает значительно больше времени, вследствие чего они будут отставать. На гелях после пульс-электрофореза целые хромосомы бактерий или дрожжей выявляются в виде отдельных полос (рис. *4-64, В),* и поэтому можно легко определить хромосомные перестройки. Более того, используя гибридизацию молекул клонированной ДНК данного геля для поиска комплементарных последовательностей в геле, удалось картировать множество генов у дрожжей (см. разд. 4.6.8).

Если не произвести мечение или окраску ДНК, полосы в агарозных или полиакриламидных гелях останутся невидимыми. Один из самых эффективных методов окраски ДНК состоит в выдерживании геля после электрофореза в растворе красителя *бромистого этидия,* который флуоресцирует под ультрафиолетовым светом после связывания с ДНК (рис. *4-64, Б* и *В).* Еще более чувствительный метод детекции основан на включении радиоизотопов в молекулы ДНК до электрофореза; для этого обычно используют ^{32}P, который включается в фосфаты ДНК и испускает β-частицу достаточно высокой энергии, чтобы её можно было выявить с помощью метода радиоавтографии (рис. 4-64, А).

4.6.5. Очищенные молекулы ДНК можно метить радиоизотопами in vitro [41]

Для мечения очищенных молекул ДНК радиоизотопами широко используются два метода. В первом случае в молекулу ДНК с помощью ДНК-полимеразы I *E coli* вводят радиоактивно меченные нуклеотиды (рис. 4-65, *А).* При этом получают радиоактивные «ДНК-зонды», используемые в реакциях гибридизации нуклеиновых кислот (см. ниже). Во втором методе фермент полинуклеотидкиназа из бактериофага используется для переноса отдельных фосфатов, меченных ^{32}P, с АТР на 5 '-конец каждой из цепей ДНК (рис. 4-65, Б). Поскольку каждая из цепей ДНК метится с помощью киназы только одним атомом ^{32}P, молекулы ДНК обычно недостаточно радиоактивны, чтобы использоваться в качестве зондов ДНК; однако то, что помеченными цепи ДНК оказываются только по одному концу, делает их очень удобными для секвенирования и «футпринтирования», что будет обсуждаться ниже.

4.6.6. Выделенные фрагменты ДНК можно легко секвенировать [42]

В конце 70-х годов были разработаны методы для простого и быстрого определения последовательности нуклеотидов (секвенирования) любых очищенных фрагментов ДНК. Вслед за этим были определены полные последовательности нуклеотидов многих генов млекопитающих, включая гены, кодирующие гемоглобин, инсулин и цитохром *с*. Объем информации о последовательностях ДНК столь велик (многие миллионы нуклеотидов), что для хранения и анализа имеющихся данных необходимо использовать компьютеры. Секвенировано несколько протяженных последовательностей ДНК, содержащих более 10^5 пар нуклеотидов; среди них полный геном вируса Эпштейна-Барр (вызывающего у человека инфекционный мононуклеоз), а также полный геном хлоропластов растений. В настоящее время широко используются два различных метода **секвенирования ДНК;** принципы, лежащие в основе *химического метода* иллюстрированы рис. 4-66 и 4-67, *ферментативный метод* объясняется на рис. 4-68.

Эти методы настолько быстры и надежны, что, когда перед исследователем стоит задача выяснения последовательности аминокислот в белке, оказывается целесообразным провести секвенирование соответствующего гена и реконструировать последовательность аминокислот на основании генетического кода. Хотя считывание любой ДНК может происходить в принципе с шестью различными рамками считывания (по три в каждой цепи), истинную рамку считывания определяют по следующему свойству: обычно это единственная рамка считывания, в которой стоп-кодоны встречаются редко (см. разд. 5.1.6). Чтобы убедиться в том, что выводя последовательность аминокислот в белке из последовательности нуклеотидов в соответствующем гене, мы не ошиблись.

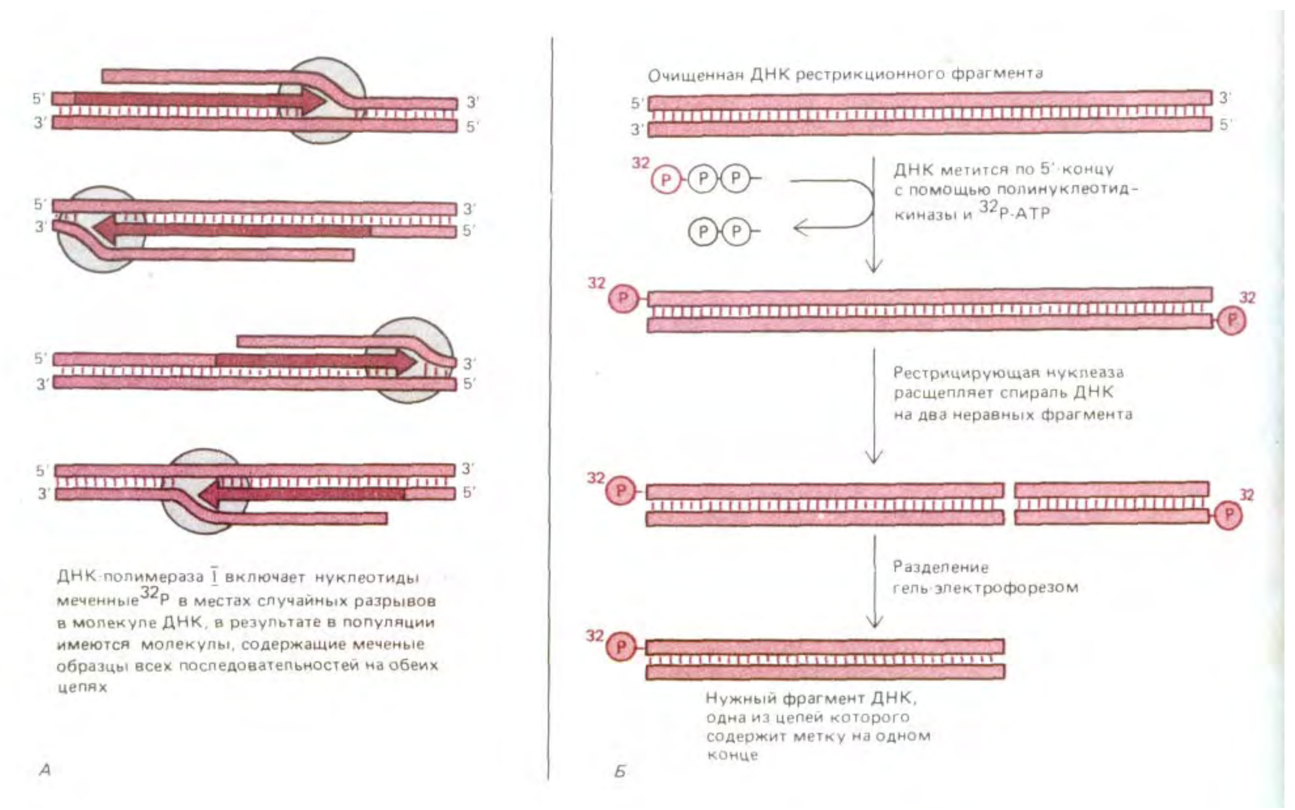


Рис. 4-65. Два ферментативных метода, используемые обычно для получения радиоактивных молекул ДНК. *А,* ДНК-полимеразой I метят все нуклеотиды в молекуле ДНК, что позволяет получить высокорадиоактивные ДНК-зонды. *Б.* Полинуклеотид-киназа метит только 5'-концы ДНК. Если мечение ДНК сочетают с обработкой рестрикционной нуклеазой, как указано на рисунке, фракция молекул ДНК, содержащих меченные по 5'-концу отдельные цепи, может быть довольно легко зарегистрирована.

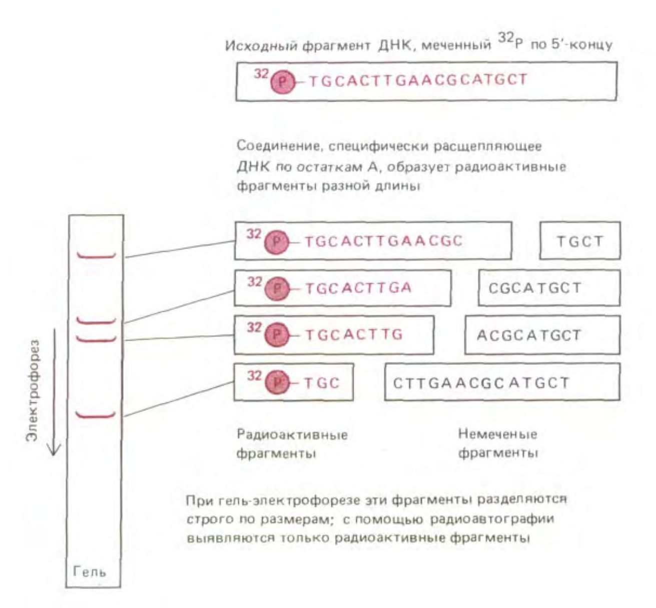


Рис. 4-66. Семейство меченных по 5'-концу фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции по определенному нуклеотиду (в данном случае основание А). Анализируемая цепь ДНК - продукт денатурации двухцепочечной молекулы, выделенной с помощью метода, описанного на рис. 4-65, *Б.* Эту цепь подвергли мягкой химической обработке, удаляющей из цепи некоторое количество одного из четырех нуклеотидов; при этом большинство таких нуклеотидов остаются в цепи. Поскольку только фрагменты, указанные на рисунке слева, содержат 5'-конец и ^{32}Р-фосфатную группу на ней, именно эти фрагменты регистрируются после радиоавтографии геля. Данная процедура лежит в основе химического метода секвенирования ДНК, описанного на рис. 4-67.

следует прямо секвенировать небольшой участок аминокислотной последовательности в очищенном белке.

Модификация метода секвенирования ДНК, представленная на рис. 4-66 и 4-67, может быть использована для выявления в ДНК последовательностей, опознаваемых ДНК-связывающими белками. Связывание этих белков с регуляторными участками ДНК (которые обычно локализованы вне кодирующих участков генов), по-видимому, играет важную роль в определении того - какие именно гены активны в данном типе клеток. Понимание функции этих белков чрезвычайно важно для идентификации специфических последовательностей, с которыми они связываются. Для выявления таких последовательностей обычно используют метод, именуемый **ДНК-футпринтинг.** Сперва очищенный фрагмент ДНК метят по одному концу ^{32}Р и затем расщепляют с помощью нуклеазы или химического соединения, делающего случайные разрезы в двойной спирали ДНК. Фрагменты, которые образуются из меченой цепи, разделяют на геле и выявляют на радиоавтографе; после этого сравнивают расположение полос ДНК, образуемых в присутствии и в отсутствие ДНК-связывающих белков. Если связывание произошло, нуклеотиды в сайте расщепления оказываются защищен-

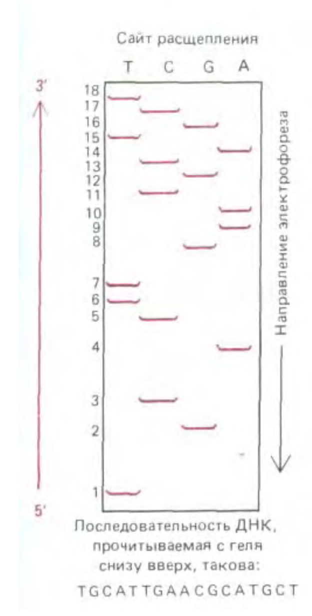
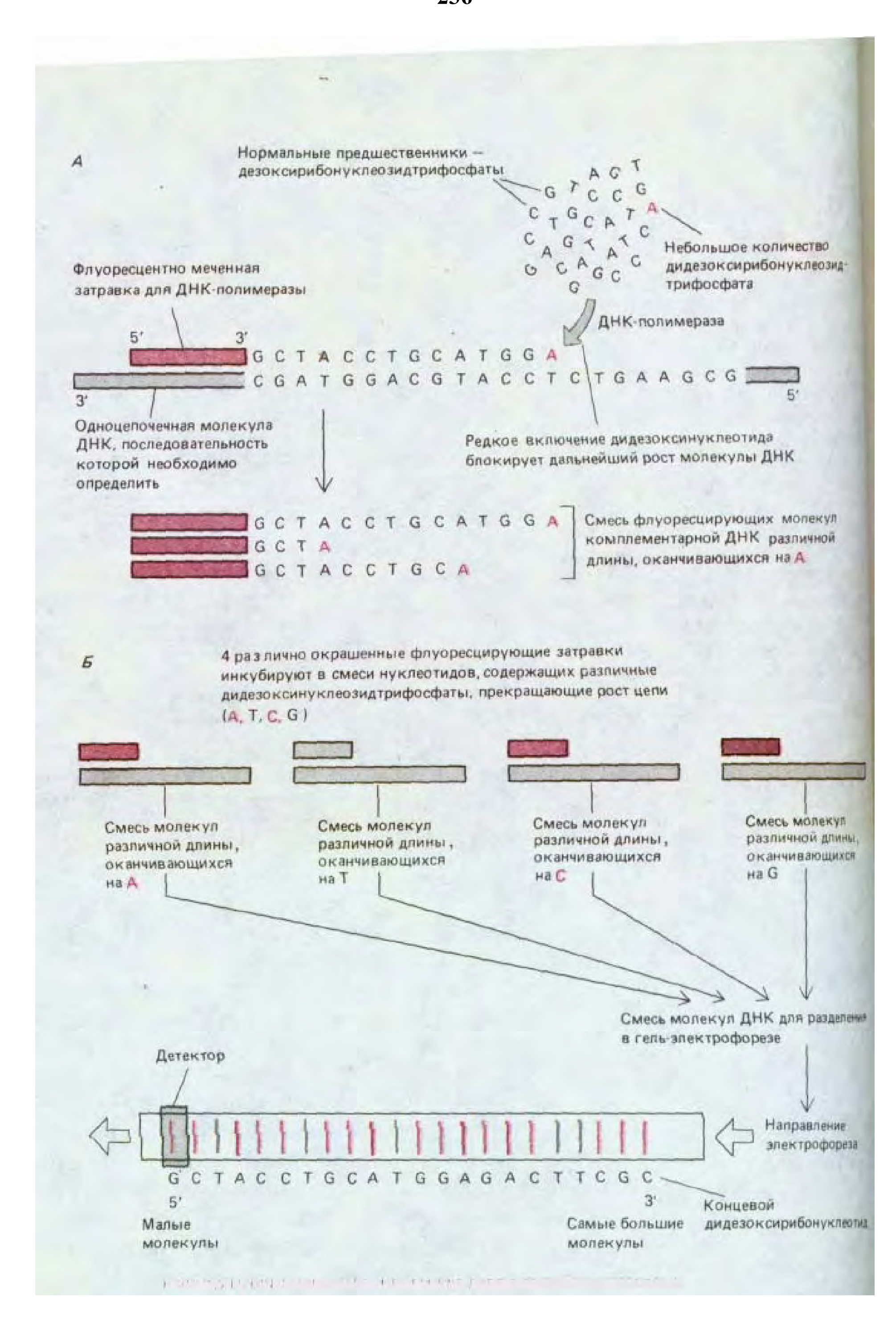


Рис. 4-67. Химический метод секвенирования ДНК. Процедура, описанная на рис. 4-66, выполняется одновременно для четырех одинаковых проб ДНК. При этом используют химические агенты, расщепляющие ДНК в первом случае по Т, во втором по С, в третьем по G и четвертом по А. Полученные образцы подвергают электрофорезу на параллельных дорожках одного геля, как это указано на рис. 4-64, *А.* Анализируя результаты электрофореза, можно определить последовательность ДНК. Так, первая снизу полоса соответствует нуклеотиду, расположенному на 5'-конце. При этом определяют, на какой из дорожек расположена полоса, - в данном случае это Т. Для определения полной последовательности эту же процедуру выполняют на уровне второй, затем третьей полосы и так далее. В данном случае метод идеализирован; на самом деле химическая обработка менее специфична, чем указано здесь.



Молекулы, оканчивающиеся каждым из дидезоксирибонуклеотидов, выявляют в виде окрашенных полос по соответствующим окрашенным затравкам. Таким образом можно прямо прочесть последовательность цепи комплементарной ДНК по мере прохождения детектором полос А

Рис. 4-68. Метод секвенирования нуклеиновых кислот, основанный на энзиматическом введении нуклеотида, терминирующего цепь. Ключевым для этого метода является использование дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов, в которых дезоксирибоза-3'-ОН, представленная в нормальных нуклеотидах, в данном случае отсутствует; внедряясь в цепь ДНК, такой модифицированный нуклеозид блокирует присоединение следующего нуклеозида. *А.* Синтез in vitro молекулы ДНК в присутствии затравки, а также небольшого количества одного из таких модифицированных нуклеозидов приводит к образованию «лесенки» фрагментов ДНК, представленных на рис. 4-66. Если для получения таких фрагментов применяют радиоактивную ДНК, проводят четыре различные реакции синтеза, каждая из которых использует различные нуклеозиды, терминирующие цепь, а электрофоретический анализ проводят на четырех параллельных дорожках геля, можно определить последовательность нуклеотидов в ДНК (см. рис. 4-67, а также рис. 4-64, *А). Б.* Более современная модификация метода, в которой четыре набора фрагментов, меченные различным образом, автоматически анализируются по флуоресценции в процессе движения по одной дорожке геля.

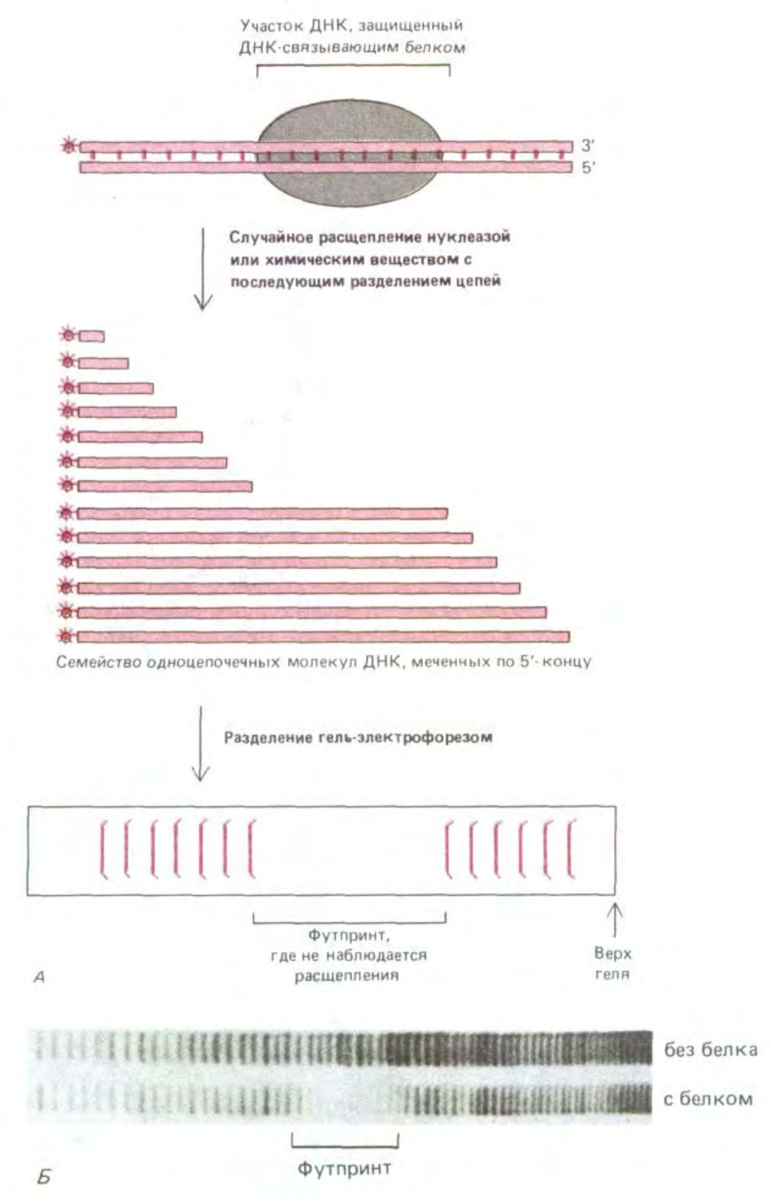


Рис. 4-69. Метод футпринтирования ДНК. *А.* Белок плотно связывается со специфическим участком ДНК из восьми нуклеотидов и защищает его от расщепляющего агента. Если реакция выполняется без белка, связывающегося с ДНК, на геле проявится полный набор полос (не указано). *Б.* Реальный футпринт, использованный для определения участка связывания для белка человека, стимулирующего транскрипцию некоторых генов эукариот. Из результатов следует, что данный сайт расположен за 60 нуклеотидов до сайта инициации синтеза РНК. В качестве расщепляющего агента использовали низкомолекулярное железосодержащее органическое вещество. Это вещество в норме расщепляет каждую из фосфодиэфирных связей практически с равной частотой. *(Б - с* разрешения Michelle Savadogo, Robert Roeder.)

ными от действия нуклеазы. В результате меченые фрагменты, содержащие участок нуклеазы. В результате меченые фрагменты, содержащие участок связывания, отсутствуют, и на геле возникает промежуток, не содержащий фрагментов ДНК, именуемый «футпринт», или «отпечаток ноги» (рис. 4-69, *А).* На рис. 4-69, Б представлен футпринт белков, активируют их транскрипцию эукариот.

4.6.7. Реакция гибридизации нуклеиновых кислот - чувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов [43]

Если водный раствор ДНК нагреть до 100°С и сильно защелочить (рН 13), то комплементарные пары оснований, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушатся и ДНК быстро диссоциирует на две

цепи. Этот процесс, называемый *денатурацией* ДНК, ранее считала необратимым. Однако в 1961 году было обнаружено, что если комплементарные цепи ДНК выдержать при температуре 65 °С, они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали (процесс, получивший название **ренатурации** или **гибридизации).** Подобные процессы гибридизации могут происходить между двумя любыми одинарными цепями нуклеиновых кислот (ДНК—ДНК, РНК—РНК, ДНК—РНК; при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов.

Скорость формирования двойной спирали лимитируется вероятностью столкновения двух комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот, что в свою очередь определяется их концентрацией в растворе. Скорость гибридизации может быть использована для определения концентрации любых последовательностей РНК или ДНК в смеси, содержащей и другие последовательности нуклеиновых кислот. Для этого теста необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к той последовательности, которую нужно обнаружить. Этот фрагмент ДНК можно получить клонированием, а если последовательность короткая, ее можно синтезировать химическими методами. В любом случае фрагмент ДНК интенсивно метят ^{32} Р (см. рис. 4-65) с тем, чтобы можно было следить за включением этой молекулы в состав дуплексов в процессе реакции гибридизации, Одноцепочечная молекула ДНК, используемая здесь в качестве индикатора, называется **ДНК-зонд;** она может содержать от 15 до 1000 нуклеотидов.

Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов настолько чувствительна и избирательна, что с ее помощью можно идентифицировать последовательности, присутствующие в концентрации 1 молекула на клетку (рис. 4-70). Это позволяет определить, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки. Этот же метод весьма эффективен для поиска неидентичных, но родственных генов; например, после клонирования интересующих исследователя генов мыши или курицы, их последовательности могут быть использованы для поиска соответствующих генов в геноме человека.

ДНК-зонды применяют и в реакциях гибридизации с РНК до выявления экспрессии данного гена в клетках. В этом случае ДНК-зонд, содержащий часть последовательности гена, пытаются гибридизовать с РНК, выделенной из анализируемой клетки. Если гибридизация происходит, проводят количественное определение экспрессии. Более усовершенствованные методики предполагают обработку ДНК-зонда специфическими нуклеазами для обнаружения участков, гибридизующих с клеточной РНК. Таким образом можно определить начальные и концевые участки транскриптов РНК (рис. 4-71); этот же метод может быть полезен для выяснения точных границ участков, вырезаемых из транскриптов РНК в процессе *сплайсинга РНК.*

В процессе развития эмбриона происходит включение и выключение больших групп генов и этот процесс скоординирован. Гибридизация ДНК-зонда с клеточными РНК позволяет ответить на вопрос, работает или молчит определенный ген; более того, при изменении уровня экспрессии гена можно узнать, зависит ли это изменение от контроля,

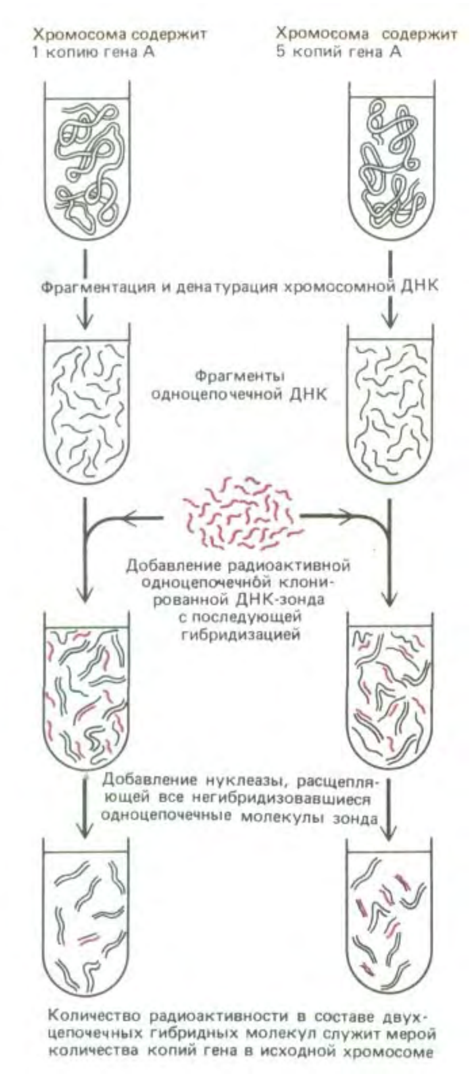


Рис. 4-70. Измерение количества копий определенного гена в образце ДНК с помощью гибридизации ДНК. Одноцепочечный радиоактивный фрагмент ДНК, используемый в таких экспериментах, называют ДНК-зондом. Хромосомная ДНК в данном случае не содержит радиоактивных атомов.

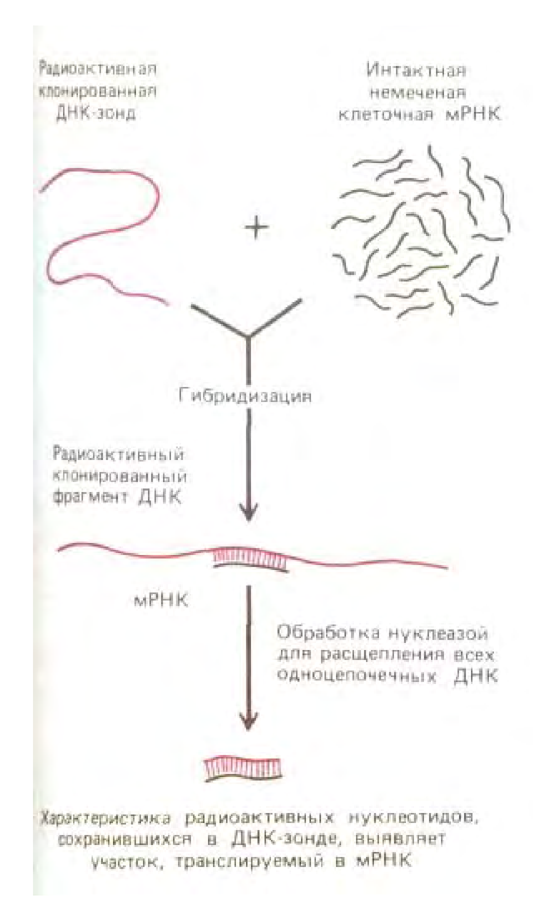


Рис. 4-71. Использование гибридизации нуклеиновых кислот для определения участка клонированного фрагмента ДНК, который транскрибируется в мРНК. Данный метод предполагает обработку нуклеазой, расщепляющей цепи ДНК, не спаренные с комплементарной цепью РНК. Этот метод позволяет точно выявлять начало и конец молекулы РНК. Аналогичные процедуры эффективны и для определения расположения нитронов (некодирующих последовательностей эукариотических генов).

действующего на уровне транскрипции ДНК, сплайсинга РНК или же трансляции зрелых молекул мРНК в белок. Методы гибридизации в современной клеточной биологии используются настолько широко, что даже трудно представить, как можно было бы без них изучать структуру генов и их экспрессию.

4.6.8. Методы Нозерн- и Саузерн-блоттинга позволяют гибридизовать молекулы нуклеиновых кислот, предварительно фракционированные с помощью электрофореза [44]

Для выявления молекул нуклеиновых кислот, последовательность которых комплементарна всему зонду или его участку, ДНК-зонды часто используются в сочетании с гель-электрофорезом. Множество различных молекул РНК и ДНК, содержащихся в смеси, фракционируют электрофорезом согласно размеру и после этого проводят реакцию гибридизации; если проба метит молекулы одного или нескольких размеров, можно быть уверенным, что гибридизация достаточно специфична. В некоторых случаях очень ценной является информация даже о размере гибридизуемых молекул ДНК. Это будет проиллюстрировано следующим примером.

Допустим, что перед исследователем стоит задача определить природу дефекта у мутантной мыши, синтезирующей аномально низкое количество альбумина (белка, который в норме секретируется в кровь клетками печени в значительных количествах). Для этого прежде всего необходимо взять образцы ткани печени у дефектных и нормальных мышей (последние служат в качестве контролей) и обработать клетки сильным детергентом для инактивации клеточных нуклеаз, которые в противном случае могут разрушить нуклеиновые кислоты. Затем отделяют РНК и ДНК от всех других компонентов клетки: присутствующие белки при этом полностью денатурируются, их удаляют последовательной экстракцией фенолом - мощным органическим растворителем. Нуклеиновые кислоты остаются в водной фазе. Чтобы их отделить от низкомолекулярных клеточных соединений, проводят осаждение спиртом. После этого ДНК отделяют от РНК, пользуясь их различной растворимостью в спиртах и обрабатывают высокоспецифическими ферментами (соответственно РНКазой или ДНКазой), чтобы освободиться от нежелательных примесей нуклеиновых кислот.

Для анализа РНК, кодирующих альбумин, с помощью ДНК-зонда используется метод **Нозерн-блоттинга.** На первом этапе с помощью гель-электрофореза, фракционируют интактные молекулы РНК дефектных и контрольных клеток печени и получают набор полос. Для того чтобы молекулы РНК, содержащиеся в геле, сделать более доступными ДНК-зонду, осуществляют перенос (блоттинг) фракционированных молекул РНК из геля на лист нитроцеллюлозы. На следующем этапе лист нитроцеллюлозы инкубируют с раствором, содержащим меченый ДНК-зонд. Полосы РНК, гибридизующиеся с зондом, выявляют методом радиоавтографии (рис. 4-72). Известно, что скорость движения молекул нуклеиновых кислот в геле зависит от их размера: при электрофорезе малые молекулы перемещаются быстрее, чем большие. Сравнивая

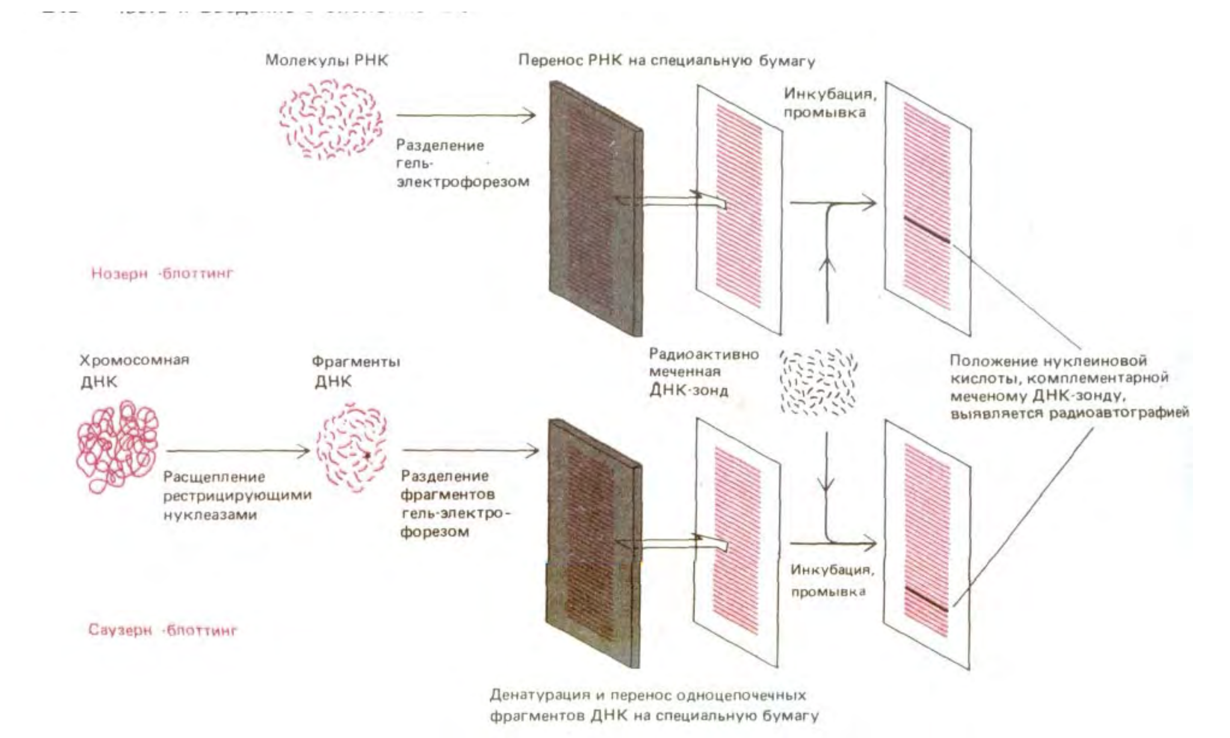


Рис. 4-72. Методы «Нозерн»- и «Саузерн»-блоттинга. После электрофоретического фракционирования смеси молекул ДНК или РНК в агарозном геле проводят перенос различных фрагментов нуклеиновых кислот на лист нитроцеллюлозы или найлона («блоттинг»). Этот лист затем инкубируют с радиоактивным ДНК-зондом в течение длительного времени в условиях, способствующих гибридизации. Затем лист тщательно промывают, так что радиоактивно меченными оказываются лишь те фрагменты, которые гибридизуются с ДНК-зондом. На радиоавтографе, полученном с листа нитроцеллюлозы, эти фрагменты выявляются в виде полос.

скорость миграции молекул интересующего нас образца и молекул РНК известного размера (стандарты РНК), можно определить размеры каждой молекулы, связывающей зонд. При этом может оказаться, что клетки печени дефектных мышей синтезируют РНК альбумина в нормальных количествах и размер этих молекул соответствует норме. Если бы это было не так, выявлялось бы уменьшенное количество молекул РНК нормального альбумина. Возможен также вариант, когда молекулы РНК из дефектных клеток печени окажутся укороченными и вследствие этого будут перемещаться в геле быстрее, чем в норме. В этом последнем случае блот, содержащий дефектные молекулы РНК, можно подвергнуть повторной гибридизации с более чувствительными ДНК-зондами для выявления утраченных участков.

Для анализа структуры гена альбумина дефектных мышей был использован метод **Саузерн-блоттинга.** В данном случае вместо РНК анализируется ДНК. Изолированную ДНК сначала обрабатывают рестрицирующими нуклеазами, затем полученные фрагменты разделяют по размеру гель-электрофорезом и выявляют комплементарные ДНК-зонду альбумина с помощью переноса и гибридизации, как это описано для РНК (см. рис. 4-72). Повторяя эту процедуру с различными рестрицирующими нуклеазами, можно получить детальную рестрикционную карту генома в участке альбуминового гена (см. разд. 4.6.2). Анализируя эту карту, можно ответить на вопрос, несет ли альбуминовый ген у дефектных животных перестройки, например, делеции или инсерции коротких фрагментов ДНК.

4.6.9. Искусственные ДНК-зонды позволяют проводить дородовую диагностику наследственных болезней [45]

Пока микробиологи разрабатывали методы клонирования ДНК, химики-органики усовершенствовали методы синтеза коротких фрагментов

ДНК. В настоящее время это делают с помощью приборов, способных автоматически синтезировать любые последовательности из 80 нуклеотидов в течение ночи. Умение получать молекулы ДНК заданной последовательности дает возможность перестраивать гены, что является важным аспектом генной инженерии (гл. 5).

Существенной областью применения *ДНК-олигонуклеотидов* является дородовая (пренатальная) диагностика наследственных заболеваний. Более 500 наследственных болезней человека связаны с нарушением какого-то одного гена. В большинстве случаев эти мутации рецессивны. Это означает, что болезнь развивается, если человек получает дефектные копии гена сразу от обоих родителей. Одна из задач современной медицины состоит в том, чтобы выявлять такие аномальные эмбрионы до рождения, информировать об этом мать и дать ей возможность прекратить беременность. Например, для серповидноклеточной анемии известна точная нуклеотидная замена в мутантном гене (последовательность GAG заменена на GTG в цепи ДНК, кодирующей β-цепь гемоглобина). В данном случае синтезируют два олигонуклеотида. Один из них соответствует последовательности нормального гена в участке предполагаемых мутаций, другой несет замену, обусловливающую болезнь. В условиях когда эти последовательности достаточно коротки (примерно 20 нуклеотидов) и при температуре гибридизации, при которой стабильность сохраняют лишь точно совпадающие цепи, можно использовать радиоактивные зонды. Тест состоит в том, что из эмбриональных клеток, содержащихся в амниотической жидкости (ее получают в ходе процедуры, называемой амниоцентезом), выделяют ДНК и используют ее для Саузерн-блоттигна с радиоактивными ДНК-зондами. Дефектный эмбрион легко опознается, поскольку его ДНК будет гибридизоваться только с олигонуклеотидом, комплементарным мутантной последовательности ДНК. К сожалению, для большинства наследственных болезней дефект на уровне ДНК еще не расшифрован, однако круг заболеваний, для которых применяется дородовая диагностика, постоянно расширяется. Это стало возможно благодаря использованию феномена полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В данном случае с помощью гибридизации выявляют наличие или отсутствие определенных сайтов рестрикции, тесно сцепленных с дефектными генами.

4.6.10. Гибридизация позволяет выявлять и отдаленно родственные гены [46]

Возникновение новых генов в ходе эволюции связано с дивергенцией и дупликацией старых генов, а также объединением участков генов в новых комбинациях. По этой причине большинство генов имеют в геноме семейства родственные последовательности, часть которых, по-видимому, обладает и близкой функцией. Выделение ДНК-клона, соответствующего первому из членов такого генного семейства, - процедура весьма трудоемкая (разд. 5.6.5). Однако выделение остальных генов этого семейства упрощается, поскольку первый ген может быть использован в качестве зонда. Поскольку в родственных генах маловероятно присутствие идентичных последовательностей, гибридизацию *с* ДНК-зондами обычно выполняют в менее строгих условиях. Благодаря этому даже неполное соответствие последовательности зонда позволяет сформировать стабильную двойную спираль (рис. 4-73).

Хотя использование нестрогой гибридизации сопровождается повышением вероятности получения фальшивых сигналов от случайных участков гомологии коротких последовательностей в неродственных участках ДНК, такая гибридизация представляет собой одно из наиболее удачных применений технологии рекомбинантных ДНК. Например, этот

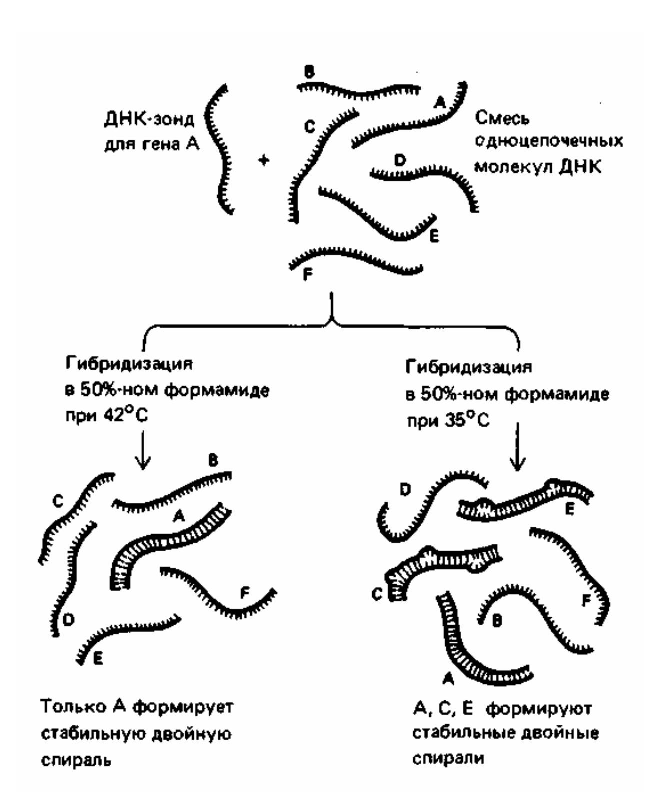


Рис. 4-73. Сравнение нескольких модификаций метода гибридизации, отличающихся различной жесткостью условий. В реакции слева *(жесткие условия)* температура раствора поддерживается лишь на несколько градусов ниже температуры денатурации полностью комплементарной спирали ДНК (ее температуры плавления). В этих условиях спирали, совпадающие не полностью и формирующиеся при пониженной жесткости (см. справа), оказываются нестабильными. Справа - указаны условия гибридизации, используемые для поиска родственных генов, не полностью идентичных гену А.

подход привел к выделению всего семейства ДНК-связывающих белков, которые функционируют в качестве ключевых регуляторов экспрессии генов в ходе раннего эмбрионального развития *Drosophila* (см. разд. 16.5.19). Этот же подход был использован для идентификации родственных этому семейству генов из других организмов, включая человека.

4.6.11. Для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот в хромосомах и клетках используют гибридизацию in situ [47]

Все макромолекулы клетки, и в том числе нуклеиновые кислоты, занимают в тканях и клетках строго определенное положение. Экстрагирование этих молекул из тканей или клеток путем гомогенизации приводит к потере той части информации, которая относится к расположению нуклеиновых кислот в клетках. Поэтому были разработаны методы для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот in situ - в изолированных хромосомах, в определенных типах клеток, где ДНК- и РНК-зонды используются примерно так же, как меченые антитела. Этот метод называют гибридизацией in situ. Его применяют для анализа ДНК в хромосомах и РНК в клетках. Высокорадиоактивные зонды нуклеиновых кислот гибридизуют с хромосомами после кратковременного воздействия высоким pH с целью разделения пар оснований ДНК. Участки хромосом, связывающие радиоактивные зонды в процессе гибридизации, выявляются радиоавтографией. Пространственное разрешение этого метода может быт повышено при использовании не радиоактивно меченных, а химически меченных зондов ДНК. Как правило, при синтезе зондов используют нуклеотиды, содержащие боковую цепь биотина, и гибридизовавшиеся пробы выявляются при окраске стрептавидином (молекулы которого расположены в виде сети) или с помощью иных маркерных молекул (рис. 4-74). Были также разработаны методы гибридизации in situ, позволяющие судить о распределении специфических молекул РНК в клетках внутри тканей, В этом случае ткани не подвергают воздействию высоких значений pH, так что хромосомная ДНК остается в двухцепочечном состоянии и не может связывать зонд. Однако если ткань подвергнуть слабой фиксации,

РНК, содержащаяся в ней, при инкубации ткани с комплементарным ДНК-зондом обеспечивает возможность гибридизации. Таким способом удалось наблюдать, как реализуется дифференциальная активность генов *Drosophila* (рис. 4-75). Этот подход позволил существенно продвинуться в изучении молекулярных механизмов дифференцировки различных клеток эмбриона.

4.6.12. Методы рекомбинантных ДНК дают возможность изучать даже минорные белки клеток [48]

До недавнего времени изучение клеточных белков было ограничено лишь мажорными фракциями, т.е. белками, содержащимися в клетках в относительно большом числе. С помощью обычных методов хроматографии и электрофореза из нескольких сот граммов клеточной массы можно получить примерно 0,1 г (100 мг) одного из мажорных белков, составляющих 1% или более от всего количества клеточных белков. Этой массы белка вполне достаточно для изучения его аминокислотной последовательности, детального анализа биологической или ферментативной (если таковая имеется) активности и получения антител, которые могут быть использованы для локализации белков в клетках. Более того, когда удается вырастить подходящие кристаллы, то с помощью рентгеноструктурного анализа можно установить трехмерную структуру молекулы. Именно таким образом была определена структура и функция многих распространенных белков, в том числе гемоглобина, трипсина, иммуноглобулина и лизоцима.

Эукариотическая клетка содержит тысячи различных белков, но значительное большинство этих белков, и в том числе наиболее интересные, присутствуют в небольшом количестве. Некоторые из них иногда чрезвычайно трудно, если не невозможно, получить в чистом виде в количестве, превышающем несколько микрограмм. Разработка методов рекомбинантных ДНК сделала доступными любые клеточные белки (включая минорные белки) в больших количествах. Для этого клонируют ген нужного белка и затем встраивают его в специальную плазмиду, именуемую *клонирующим вектором.* Этот вектор сконструирован таким образом, что будучи введенным в бактерии, дрожжи или клетки млекопитающих соответствующего типа, он обеспечивает крупномасштабный синтез этого белка. Таким образом, если раньше для детальных структурных или функциональных исследований были доступны лишь немногие белки, в настоящее время практически все белки клетки могут быть предметом подобных исследований.

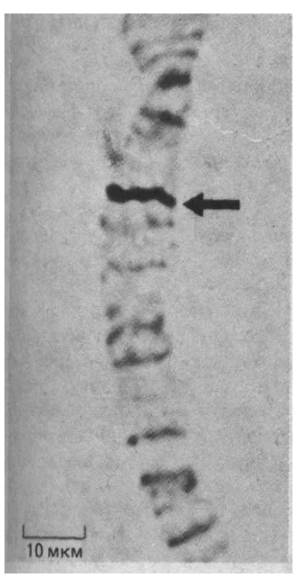


Рис. 4-74. Локализация гена на политенной хромосоме *Drosophila* с помощью гибридизации in situ с клонированным ДНК-зондом, меченным биотином. ДНК этой гигантской хромосомы частично денатурирована для гибридизации с ней зонда. После гибридизации и отмывки зонда, хромосомы обрабатывают ферментативным комплексом, в составе которого пероксидаза хрена конъюгирована со стрептавидином (см. рис. 4-58, Б). Чтобы выявить участок связывания зонда, препарат обрабатывают перекисью водорода и окрашивают; при этом пероксидаза обнаруживается в виде темной полосы на препарате (стрелка). (С любезного разрешения Tod Leverty, Gerald Rubin.)

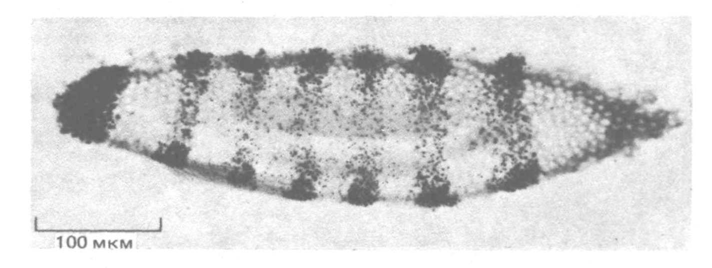


Рис. 4-75. Радиоавтограф среза очень раннего эмбриона *Drosophila,* подвергнутого гибридизации in situ с использованием радиоактивного ДНК-зонда, который комплементарен гену, принимающему участие в формировании сегментов *ftz.* Зонд гибридизуется с РНК эмбриона, и расположение зерен серебра после проявления указывает на то, что РНК, синтезируемая геном *ftz,* локализована в регулярных полосах, тянущихся поперек всего эмбриона. Ширина полос соответствует трем-четырем клеткам. На этих стадиях развития (клеточная бластодерма) эмбрион состоит примерно из 6000 клеток. (Из E. Hafen, A. Kuroiwa, W. J. Gehring. Cell, 37; 833-841, 1984.)

4.6.13. Функция генов наиболее ярко проявляется в организме мутантов [49]

Предположим, что кому-то удалось клонировать ген, кодирующий вновь открытый белок. Как установить внутриклеточную функцию данного белка? Задача эта весьма непроста, поскольку ни трехмерная структура белка, ни полная нуклеотидная последовательность гена этого белка не позволяют судить о его функции. Кроме того, многие белки, например, структурные белки и белки сложных мультиферментных комплексов, будучи отделены от других компонентов сложной функциональной единицы, в состав которой они входят, не проявляют своей обычной активности.

Один из подходов, которые мы уже рассматривали (см. разд. 4.5.6) состоит в том, чтобы инактивировать определенный белок с помощью специфических антител и пронаблюдать за тем, какие клетки затронуты вследствие этого. В некоторых случаях такой способ позволяет достаточно надежно определить функцию белка, однако в отношении внутриклеточных белков он не очень эффективен, поскольку микроинъецированные антитела подвергаются разведению в процессе пролиферации клеток либо разрушаются в результате внутриклеточной деградации. Более удачное решение этой проблемы возможно с помощью генетических подходов. Мутанты, у которых отсутствует один из белков или, что более удобно, синтезируется его температурочувствительная форма (инактивируемая при небольшом повышении или понижении температуры), чрезвычайно полезны, когда перед исследователем стоит вопрос о функции белка. С их помощью идентифицированы функции ферментов, участвующих в основных метаболических путях бактерий. Благодаря этому подходу были открыты многие генопродукты, отвечающие за упорядоченное развитие эмбрионов *Drosophila.* Как правило, этот метод используется для изучения организмов с коротким циклом репродукции, таких, как бактерии, дрожжи, круглые черви и плодовые мушки. Воздействуя на их организм веществами, вызывающими изменения в ДНК (мутагенами), можно быстро получить большое количество мутантов и выбрать среди них тех, которые несут определенный интересующий экспериментатора дефект. Например, из популяции бактерий, подвергнутых воздействию мутагенов, были выбраны клетки, которые прекращают синтез ДНК при изменении температуры окружающей среды от 30 ° до 42 °С. Среди них было выявлено значительное число температурочувствительных мутантов, мутации в которых затрагивали бактериальные белки, участвующие в процессе репликации ДНК. Эти мутанты позже были использованы для идентификации и определения белков, необходимых для репликации ДНК.

Цикл репродукции у человека очень продолжителен. К тому же никто не станет подвергать людей целенаправленному воздействию мутагенов. Более того, следует иметь в виду, что человеческий плод, имеющий серьезные дефекты жизненно важных процессов, например репликации ДНК, погибнет задолго до рождения. Однако многие мутации могут практически не оказывать влияния на жизнеспособность - например, тканеспецифические дефекты лизосом либо рецепторов клеточной поверхности, спонтанно возникающие в человеческой популяции. Анализ фенотипа этих больных, равно как и исследование их клеток в культуре, дают возможность уникального исследования важных клеточных функций. Хотя такие мутации крайне редки, тем не менее они эффективно выявляются, поскольку их носители обращаются за медицинской помощью.

4.6.14. Клетки и организмы, содержащие измененные гены, можно исправить [50]

Получить мутантов, у которых нарушена репликация ДНК или, например, развитие глаза, в принципе довольно просто. Однако, чтобы связать этот дефект с изменением конкретного белка, могут понадобиться годы. Технология рекомбинантных ДНК дала в руки исследователей совершенно иной подход: анализ начинается с белка и завершается созданием мутантной клетки или целого организма. Поскольку такой подход по сравнению с традиционным направлением генетического анализа от гена к белку представляется обратным, его обычно называют *обратной генетикой.*

Обратная генетика начинается с выделения из клетки нужного белка. Используя методы, описанные в гл. 5, ген этого белка клонируют и определяют его нуклеотидную последовательность; затем эту последовательность меняют биохимическими методами, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Затем такой ген вводят в клетку, где он может встроиться в хромосому в процессе гомологической рекомбинации и превратиться таким образом в постоянный элемент генома. Если встроенный ген экспрессируется, то несущая его клетка и все ее потомки будут синтезировать измененный белок. В том случае, когда измененный in vitro ген вводят в оплодотворенную яйцеклетку, получается многоклеточный мутантный организм. Некоторые из таких **трансгенных организмов** передадут этот ген своим потомкам в качестве постоянного элемента клеток зародышевой линии (рис. 4-76). Такая *генетическая трансформация* в настоящее время становится обычной процедурой для плодовых мушек или млекопитающих. В принципе на сегодняшний день совершенно реальна и трансформация человека, но такие эксперименты не выполняют из страха перед возможными генетическими нарушениями, которые нельзя исключить у лиц, ставших объектом таких исследований.

4.6.15. С помощью искусственных генов, кодирующих антисмысловые РНК, можно создавать специфические доминантные мутации [51]

При введении мутантных генов в клетки бактерий или дрожжей, которые, как правило, гаплоидны, такие гены будут достаточно часто рекомбинировать с нормальными гомологами. В результате можно отобрать клетки, в которых мутантный ген заменил единственную копию нормального гена (рис. *4-77, А),* например клетки, синтезирующие определенный белок в мутантной форме. Функции нормального белка можно определить, как правило, по фенотипу мутантных клеток. Что же касается высших эукариот, таких, как млекопитающие или плодовые мушки, пока еще не созданы методы, позволяющие легко заменять



Рис. 4-76. Сравнение нормальной личинки *Drosophila* и двух мутантных личинок, содержащих дефектные гены *ftz*. Одна из дефектных (*ftz*⁻) личинок была трансформирована после инъекции в яйцеклетку, из которой она была получена клонированной ДНК, содержащей нормальную последовательность гена *ftz. Эта* дополнительная последовательность ДНК встроилась в одну из хромосом мухи и затем нормально наследовалась и экспрессировалась. Ген *ftz* необходим для нормального развития и его добавление к дефектному геному, как следует из опыта, восстанавливает сегменты личинки, отсутствующие у организмов *ftz*⁻. Методы получения трансгенных животных обсуждаются далее (см. рис. 5-88). (С любезного разрешения Walfet Gehring.)



Рис. 4-77. Ген с измененной нуклеотидной последовательностью может быть введен в хромосому организма-хозяина. У бактерий и дрожжей можно отобрать мутанты, у которых *(А)* в результате генетической рекомбинации измененный ген занял место нормального. В этом случае в клетках сохраняются только мутантные гены. У высших эукариот вместо замены происходит добавление гена *(Б).* Трансформированные клетки или организмы у них содержат помимо нормальных мутантные гены. Полагают, что у организмов, для которых характерен избыток ДНК, замены генов происходят достаточно редко, поскольку для этого необходимо, чтобы мутантный ген «нашел» среди множества других последовательностей свой нормальный гомолог и спарился с ним.

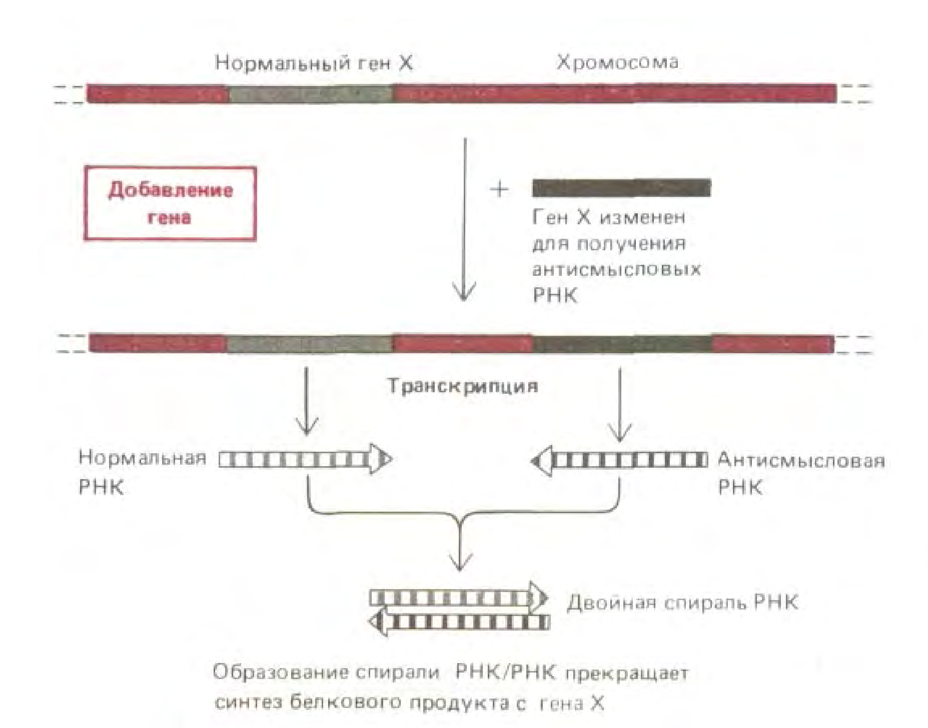


Рис. 4-78. Использование стратегии антисмысловых РНК для получения доминантных мутаций. Были сконструированы мутантные гены, синтезирующие РНК, последовательность которых комплементарна РНК, синтезируемым нормальными генами. РНК этих двух типов способны объединяться в двухцепочечные молекулы. Если синтезируется значительный избыток антисмысловых РНК, они могут гибридизоваться и таким образом инактивировать большую часть нормальных РНК, синтезируемых геном X. Полагают, что таким образом в перспективе удастся инактивировать любой ген. В настоящее время эта методика применима лишь по отношению к некоторым генам.

нормальный ген клонированным мутантным геном. Генетическая трансформация таких организмов приводит обычно к инсерции клонированного гена в случайные участки генома и при этом клетка или организм содержат мутантный ген наряду с его нормальной копией (рис. *4-77, Б).*

Было бы крайне полезно создание специфических доминантных мутаций в клетках высших эукариот путем введения мутантных генов, которые бы элиминировали активность их нормальных аналогов в клетке. Для этого используют весьма хитроумный и многообещающий подход, основанный на специфичности реакций гибридизации двух комплементарных цепей ДНК. Известно, что в норме только одна из двух цепей ДНК в данном участке транскрибируется в РНК и это всегда одна и та же цепь для данного гена. Если же клонированный ген был сконструирован таким образом, что транскрибируется только противоположно направленная цепь ДНК, появляется **антисмысловая** РНК с последовательностью, комплементарной нормальным гранскриптам РНК. В том случае, когда такая антисмысловая РНК синтезируется в достаточно больших количествах, она будет с большой частотой гибридизоваться со «смысловой» РНК, синтезируемой нормальными генами, и ингибировать синтез соответствующего белка (рис. 4-78). И если этот белок является жизненно важным для клетки или организма, описанные здесь доминантные мутанты погибнут и исследовать функции белка будет невозможно. Чтобы этого не произошло, можно сконструировать гены, синтезирующие антисмысловую РНК по команде, например, в ответ на изменение температуры или в присутствии определенной сигнальной молекулы. Клетки или организмы, содержащие такие индуцибельные антисмысловые гены, будут лишены специфического белка в определенное время, и в этом случае можно проследить за возникающим эффектом. Конечно, этот метод технически до конца еще не проработан, однако уже сейчас ясно, что он весьма перспективен для определения функции белков высших организмов.

Заключение

Технология рекомбинантных ДНК произвела революцию в исследовании клетки. В настоящее время с помощью рестрицирующих нуклеаз можно вырезать любой участок клеточной ДНК и вставить его в самореплици-

рующийся генетический элемент (плазмиду или вирус) для получения «клона геномной ДНК». С другой стороны, для получения «клона к ДНК» можно использовать ДНК-копию любой молекулы РНК. Таким образом, можно получить неограниченное количество высокоочищенной ДНК, определить ее нуклеотидную последовательность (скорость этой операции составляет сотни нуклеотидов в день), а также аминокислотную последовательность кодируемого ею белка. Методы генной инженерии позволяют синтезировать мутантные гены и вводить их в хромосомы клеток, где они в последующем превращаются в постоянный элемент генома. И если для переноса генов в качестве реципиента использовать оплодотворенное яйцо, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его своим потомкам. Для клеточной биологии исключительно важно, что описанные методы дают возможность изменять клетки строго направленным образом, что в свою очередь позволяет оценить влияние на клетку изменения структуры определенного белка.

Применение технологии рекомбинантных ДНК открывает широкие перспективы. С помощью этих методов клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих могут быть преобразованы в «фабрики» для масштабного производства любого белка. Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков или использовать их в качестве лекарственных средств. Кроме того, на технологии рекомбинантных ДНК основано получение высокоспецифических ДНК-зондов, с помощью которых изучают экспрессию генов в тканях, локализацию генов в хромосомах, выявляют гены, обладающие родственными функциями.

Литература

Общая

Cantor C. R., Schimmel P. R. Biophysical Chemistry, 3 vols. New York, W. H. Freeman, 1980 (A comprehensive account of the physical principles underlying many biochemical and biophysical techniques.)

Freifelder D. Physical biochemistry, 2nd ed. New York, W. H. Freeman, 1982.

Van Holde K.E., Physical Biochemistry, 2nd ed. Englewood, NJ, Prentice-Hall, 1985.

Цитируемая

1. *Bradbury S.* An Introduction to the Optical Microscope. Oxford, U. K., Oxford University Press, 1984.
   Fawcett D.W. A Textbook of Histology, llth ed. Philadelphia, Saunders, 1986.
2. *Spencer M.* Fundamentals of Light Microscopy. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1982.
3. *Boon M. T., Drijver J. S.* Routine Cytological Staining Methods. London, Macmillan, 1986.
4. *Ploem J. S., Tanke H. J.* Introduction to Fluorescence Microscopy. Royal Microscopical Society Microscopy Handbook No. 10. Oxford, U. K., Oxford Scientific Publications, 1987.
   Willingham M. C., Pastan I. An Atlas of Immunofluorescence in Cultured Cells. Orlando, Fl, Academic, 1985.
5. *Alien R. D.* New observations of cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **14,** 265-290, 1985.
6. *Pease D. C., Porter K. R.* Electron microscopy and ultramicrotomy. J. Cell Biol., **91,** 287s-291s, 1981.
7. *Wischnitzer S.* Introduction to Electron Microscopy. 3rd ed. Elmsford, NY, Pergammon, 1981.
8. *Everhart T.E., Hayes T.L.* The scanning electron microscope. Sci. Am., **226(1),** 54-69, 1972. *Hayat M. A.* Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy. Baltimore, University Park Press, 1978.
   Kessel R.G., Kargon R.H. Tissues and Organs. New Fork, W. H. Freeman, 1979.
   (Атлас тканей позвоночных, исследованных с помощью сканирующего электронного микроскопа).

9. *Sommerville J., Scheer U. eds.* Electron Microscopy in Molecular Biology. A Practical Approach. Washington, D. C, IRL Press, 1987.
10. *Heuser J.* Quick-freeze, deep-etching preparation of samples for 3-D electron microscopy. Trends Biochem. Sci, **6**, 64-68, 1981.
Pinto da Silva P., Branton D. Membrane splitting in freeze-etching. J. Cell Biol, **45**, 598-605, 1970.
11. *Chiu W.* Electron microscopy of frozen, hydrated specimens. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **15,** 237-257, 1986.
Unwin P. N. T., Henderson R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. J. Mol. Biol., **94**, 425-440, 1975.
12. *Glusker J.P., Trueblood K.N.* Crystale Structure Analysis: A Primer. Oxford, U. K., Oxford University Press, 1985.
13. *Alzari P.M., Lascombe M.B., Poljak R.J.* Three-dimentional structure of antibodies. Annu. Rev. Immunol., **6**, 555-580, 1980.
Kendrew J.C. The three-dimentional structure of protein molecule. Sci. Am., **205(6),** 96-111, 1961. *Perutz M.F.* The hemoglobin molecule. Sci. Am., **211(5),** 64-76, 1964.
14. *Cooke R.M., Cambell I.D.* Protein structure determination by NMR. Bioessays, 8, 52-56, 1988.
Schulman R.G. NMR spectroscopy of living cells. Sci. Am., **248(1),** 86-93, 1986. *Wuthrich K., Wagner G.* Internal dynamics of proteins. Trends Biochem. Sci**., 9**, 152-154, 1984.
15. *Amman D.* Ion Selective Microelectrodes: Principles, Design and Application. Berlin, Springer-Verlag, 1986.
Auerbach A., Sachs F. Patch clamp studies on single ionic channels. Annu Rev. Biophys. Bioeng., **13**, 269-302, 1984.
16. *Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y.* A new generations of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem, **260**, 3440-3450, 1985. *Tsien r. Y., Poenie M.* Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. Trends Biochem. Sci., **11**, 450, 1986.
17. *Celis J.E., Graessmann A., Logter A. eds.* Microinjection and Organdie Transplantation Techniques. London, Academic Press, 1986.
Gomperts B. D., Fernandez J. M. Techniques for membrane permeabilization. Trends Biochem. Sci., **10**, 414-417, 1985.
Ostro M.J. Liposomes Sci. Am., **256(1),** 102-111, 1987.
Ureta T., Radojkovic J. Microinjected frog oocytes. Bioessays, **2**, 221-225, 1985.
18. *Freshney R.I.* Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. New York, Liss, 1987.
19. *Herzenberg L. A. Sweet R.G., Herzenberg L. A.* Fluorescence-activated cell sorting. Sci. Am., **234(3**), 108-116, 1976.
Kamarck M. E. Fluorescence-activated cell sorting of hybrid and transfected cells. Methods Enzymol, **151**, 150-165, 1987.
Nolan G.P., Fiering S., Nicolas J.F., Herzenberg L.A. Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of *E. coli lac Z.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **85**, 2603-2607, 1988.
20. *Harrison R.G.* The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J. Exp. Zool., **9**, 787-848, 1910.
21. *Ham R.G.* Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. PNAS, **53**, 288-293, 1965.
Loo D. T., Fuquay J. /., Rawson C. L., Barnes D. W. Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. Science, **236**, 200-202, 1987.
Sirabasku D.A., Pardee A. B., Saw G.H., eds. Growth of Cells in Hormonally Defined Media. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
22. *Ruddle F. H., Creagan R. P.* Parasexual approaches to the genetics of man. Annu. Rev. Genet., **9**, 407-486, 1975.
23. *Colowick S. P., Kaplin N. O., eds.* Methods in Enzymology, vols. 1 -... San Diego, CA, Academic Press, 1955-1988. (Многотомное издание, содержащее общие и специальные статьи с описанием множества методов).
Cooper T.G. The Tools of Biochemistry. New York, Wiley, 1977.
Scopes R.K. Protein Purification Principles and Practice, 2nd ed. New York, Springer-Verlag, 1987.
24. *Claude A.* A coming age of cell. Science, **189**, 433-435, 1975. *de Duve C., Beaufay H.* A short history of tissue fractionation. J. Cell Biol**., 91**, 293s-299s, 1981.
Meselson M., Stahl F. W. The replication of DNA in *Escherichia coli.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **47**, 671-682, 1958. (Для демонстрации полуконсервативной репликации ДНК использовали центрифугирование в градиенте плотности).
Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science, **189**, 347-358, 1975.
Sheeler P. Centrifugation in Biology and Medical Science. New York, Wiley, 1981.

25. *Moore D.J., Howell K.E., Cook G.M. W., Ewans W.H. eds.* Cell Free Analysis of Membrane Traffic. New York, Liss, 1986.
Nirenberg N. W., Mattaei J. H. The dependence of cell free protein synthesis in *E. coli* on naturally occuring or synthetic polyribonucleotides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 1588-1602, 1961.
Racker E. A. A New Look on Mechanisms of Bioenergetics. New York. Academic Press, 1976. (Бесклеточные системы в исследовании энергетического метаболизма).
Zamecnic P. C. An historical account of protein synthesis with current overtones – a personalized view. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 1-16, 1969.
26. *Dean P. D. G., Johnson W. S., Middle F. A.* Affinity Chromatography: A Practical Approach, Arlington, VA, IRL Press, 1985.
Gilbert M. T. High Performance Liquid Chromatography. Littleton, MA, John Wright-PSG, 1987.
27. *Andrews A. T.* Electrophoresis, 2nd ed. Oxford, U. K., Clarendon Press, 1986.
Laemmli U. K. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227,** 680-685, 1970.
28. *Celis J. E., Bravo R. eds.,* Two - Dimentional Gel Electrophoresis of Proteins. New York, Academic Press, 1983.
O'Farrell P.H. High-resolution two-dimentional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021, 1975.
29. *Cleveland D. W., Fisher S. G., Kirschner M. W., Laemmli U. K.* Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel-electrophoresis. J. Biol. Chem. **252**, 1102-1106, 1977.
Ingram К М. A special chemical difference between the globins of normal human and sickle anemia hemoglobin. Nature, **178**, 792-794, 1956.
30. *Edman P., Begg G.* A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1, 80-91, 1967. (Первое описание автоматизированного секвенатора).
Hewlck R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W.J. A gas-liguid-solid phase peptide and protein seguenator. J. Biol. Chem. **256**, 7990-7997, 1981.
Sanger F. The arrangement of amino acids in proteins. Adv. Protein Chem**.** **7**, 1 -67, 1952.
Walsh K. A., Ericsson L. H. Parmelee D. C., Titani K. Advances in protein sequencing. Annu. Rev. Biochem. **50**, 261-284, 1984.
31. *Chase G.D., Rabinowltz J.L.* Principles of Radio Isotope Methodology, 2nd ed. Minneapolis, Burgess, 1962.
Dyson N. A. An Introduction to Nuclear Physics with Applications in Medicine and Biology, Chichester, U. K., Horwood, 1981.
32. *Calvin M.* The path of carbon in photosynthesis. Science, **135,** 879-889, 1962. (Один из первых случаев применения радиоизотопов в биологии).
Rogers A. W. Techniques of Autoradiography, 3rd ed. New York, Elsevier/North Holland, 1979.
33. *Anderton B. H., Thorpe R. C.* New methods of analysis of antigens and glycoproteins in complex mixtures. Immunol. Today, **2**, 122-127, 1980.
Coons A.H. Histochemistry with labelled antibody. Int. Rev. Cytol. **5**, 1-23, 1956.
34. *Milstein C.* Monoclonal antibodies. Sci. Am**., 243(4),** 66-74, 1980.
Yelton D. E., Schariff M. D. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. Annu. Rev. Biochem., **50**, 657-680, 1981.
35. *Mabuchi L, Okuno M.* The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. J. Cell Biol., **74**, 251-263, 1977.
Mulcahy L. S., Smith M. R., Stacey D. W. Requirement for ras proto-oncogene function during serum stimulated growth of NIH 3T3 cells. Nature, **313**, 241-243, 1985.
36. *Drlica K.* Understanding DNA and Gene Cloning. New York, Wiley, 1984.
Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
Watson J. D., Tooze J. The DNA Story: A Documentary History of Gene Cloning. New York, W.H. Freeman, 1981.
37. *Garoff H.* Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in the eucaryotic cell. Annu. Rev. Cell. Biol**.,** **1**, 403-445, 1985.
Jackson lan J. The real reverse genetics: targeted mutagenesis in the mouse. Trends Genet., 3, 119, 1987.
Kelly J.H., Darlington G.J. Hybrid genes: molecular appoaches to the tissue-specific gene regulation. Annu. Rev. Genet., **19**, 273-296, 1985.
38. *Nathans D., Smith H. 0.* Restriction nucleases in the analysis and reconstructuring of DNA molecules. Annu. Rev. Biochem., **44,** 273-293, 1975.
Smith H. 0. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. Science, **205**, 455-462, 1979.
39. *Cohen S.N.* The manipulation of genes. Sci. Am., **233(1),** 24-33, 1975.
Maniatis T. et al. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell, **15,** 687-701, 1978.

Nooick R.P. Plasmids. Sci. Am., **243(6),** 102-127, 1980.
40. *Cantor C. R., Smoth C. L., Mathew M. K.* Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **17**, 287-304, 1988.
Maxam A. M., Gilbert W, A new method of sequencing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 560-564, 1977.
Southern E. M. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods Enzymol., **68**, 152-176, 1979.
41. *Rigby P. W., Dieckermann M., Rhodes C., Berg P.* Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Moï. Biol, **113**, 237-251, 1977.
42. *Galas D. J., Schmitz A.* DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. Nucl. Acid Res., **5**, 3157-3170, 1978.
Gilbert W. DNA sequencing and gene structure. Science, **214**, 1305-1312, 1981.
Prober J. M., et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chainterminating dideoxynucleotides. Science, **238**, 336-341, 1987.
Tullius T. D. Chemical "snapshots" of DNA: using the hydroxyl radical to study the structure of DNA and DNA protein complexes. Trends Biochem. Sci., **12**, 297-300, 1987.
43. *Berk A.J., Sharp P. A.* Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of SI endonuclease digested hybrids. Cell, **12**, 721-732, 1977.
Hood L.E., Wilson J.H., Wood W.B. Molecular Biology of Eucaryotic Cells: A Problems Approach, pp. 56-61, 192-210, Mento Park, CA, Benjamin-Cummings, 1975.
Wetmer J. G. Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **5**, 337-361, 1976.
44. *Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R.* A method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzomethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **74**, 5350-5354, 1977.
Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Moï. Biol., **98**, 503-517, 1975.
45. *Itakura K., Rossi J. J., Wallace R. B.* Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. Annu. Rev. Biochem., **53**, 323-356, 1984.
Ruddle F. H. A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies. Nature, **294**, 115-119, 1981.
White R., Lalovel J. M. Chromosome mapping with DNA markers. Sci. Am., **258(2)**, 40-48, 1988.
McGinnis W., Garber R.L., Wirz J., Kuroiwa A., Gehring W.J. A homologous protein-coding seguence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. Cell, **37**, 403-408, 1984.
47. *Gerhard D. S., Kawasaki E. S., Bancroft F. C., Shabo P.* Localization of a unique gene by direct hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**, 3755-3759, 1981.
Huten E., Kuroiwa A., Gehring W.J. Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene fushi tarazu during *Drosophila* embryonic development. Cell, **37**, 833-841, 1984.
Pardue M. L., Gall J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of the cytological preparations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **64**, 600-604, 1969.
48. *Abelson J., Butz E., eds.* Recombinant DNA. Science, **209**, 1317-1438, 1980.
Gilbert W., Villa-Komaroff L. Useful proteins from recombinant bacteria. Sci. Am., **242(4),** 74-94, 1980.
49. *Lederberg J., Lederberg E. M.* Replica plating and inderect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol., **63**, 399-406, 1952.
Nusslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number arid polarity in *Drosophila.* Nature, **287**, 795-801, 1980.
50. *Palmiter R. D., Brinster R. L.* Germ line transformation of mice. Annu. Rev. Genet., **20**, 465-499, 1986.
Pellicer A., et al. Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. Science, **209**, 1412-1422, 1980.
Rubin G. M., Spradling A. C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science, **218**, 348-353, 1982.
Shortle D., Nathans D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. Proc. Nat. Acad. sci. USA, **75**, 2170-2174, 1978.
Struhl K. The new yeast genetics. Nature, **305**, 391-397, 1983.
51. *Melton D.A., Rebagliati M.R.* Antisense RNA injections in fertilized eggs as a test for the function of localized mRNAs. J. Embryol. Exp. Morphol., **97**, 211-221, 1986.
Rosenberg V.B., Preiss A., Seifert E., Jackle H., Knipple D.C. Production of phenocopies by Kruppel anti-sense RNA injection into *Drosophila* embryos. Nature, **313,** 703-706, 1985.
Weintraub H., Isant J. G., Harland R. M. Anti-sense RNA as a molecular tool for genetic analysis. Trends Genet., **1**, 22-25, 1985.

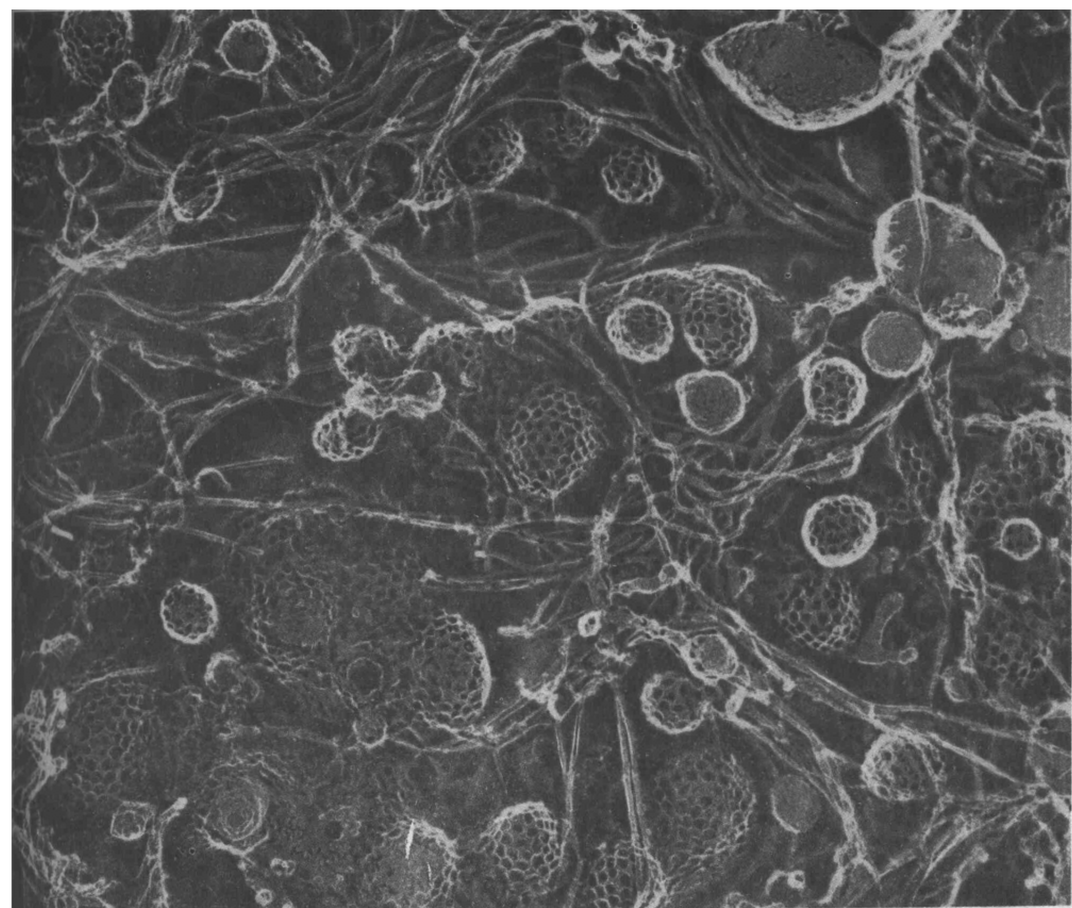


Рис. 5.1. Электронная микрофотография окаймленных ямок и пузырьков на внутренней поверхности плазматической мембраны клетки печени. (Из Hirokawa и Heuser, Cell 30: 395-406, 1982.)

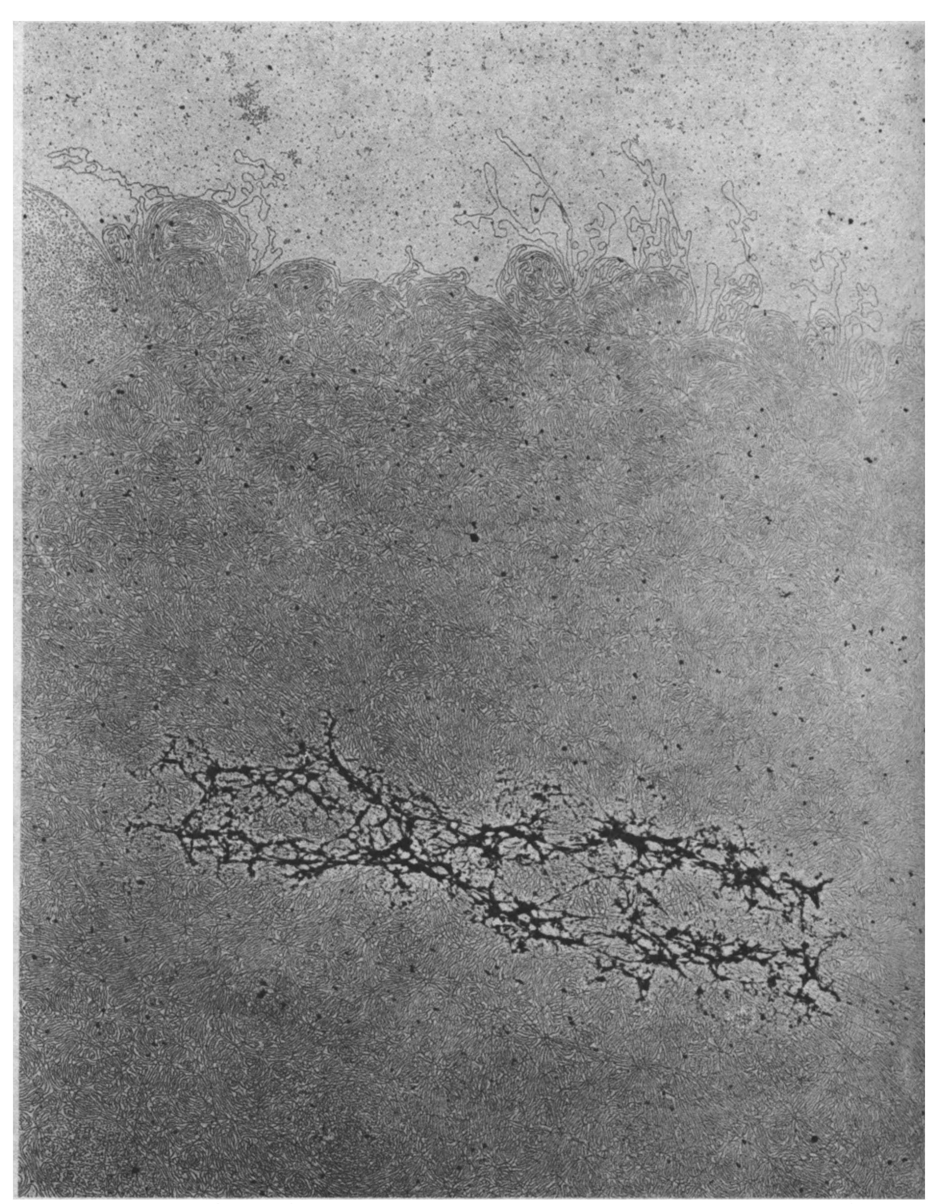


Рис. 5.П. Электронная микрофотография ДНК хромосомы человека. (С любезного разрешения Paulson и Laemmli.)

5. Основные генетические механизмы

Способность клеток поддерживать высокую упорядоченность своей организации в хаотичной Вселенной зависит от генетической информации, которая реализуется, сохраняется, воспроизводится, а иногда и совершенствуется в четырех генетических процессах - *синтезе РНК и белка, репарации ДНК, репликации ДНК и генетической рекомбинации.* Эти процессы, в которых создаются и поддерживаются клеточные белки и нуклеиновые кислоты, одномерны: в каждом из них информация, заключенная в линейной последовательности нуклеотидов, используется для образования либо для изменения другой линейной последовательности нуклеотидов (молекулы ДНК или РНК) или линейной последовательности аминокислот (молекулы белка). Поэтому генетические события проще для понимания, чем большинство других клеточных процессов, связанных с выражением информации, которую несут в себе **сложные** трехмерные поверхности белковых молекул. Быть может, именно благодаря этой относительной простоте генетических механизмов мы знаем и понимаем их гораздо лучше, чем большую часть других событий, происходящих в клетке.

В этой главе мы рассмотрим молекулярные механизмы, обеспечивающие репарацию, репликацию и изменение клеточной ДНК. Мы увидим, что эти механизмы зависят от ферментов, расщепляющих, копирующих и рекомбинирующих нуклеотидные последовательности. Мы покажем далее, что вирусы, плазмиды и мобильные генетические элементы ведут себя в отношении этих и прочих ферментов как паразиты, не только используя их для собственной репликации, но и изменяя - посредством генетической рекомбинации - клеточный геном. Заключительная часть главы посвящена тому, как знание основных генетических механизмов реализуется практически в методиках выделения генов и генных продуктов.

Для начала, однако, мы вновь вернемся к центральной теме, уже затронутой кратко в гл. 3, а именно к механизмам синтеза РНК и белка.

5.1. Синтез РНК и белка

На долю белков приходится обычно более половины сухой массы клетки и синтез их играет главную роль в таких процессах, как рост и дифференцировка клеток, поддержание их структуры и функции. Синтез белка зависит от совместного действия нескольких классов молекул РНК и ему предшествует ряд подготовительных этапов. Сначала в результате копирования ДНК, несущей информацию о синтезируемом белке, образуется молекула *матричной РНК (мРНК).* Одновременно в цитоплазме клетки к каждой из 20 аминокислот, из которых строится белок, присоединяется молекула специфической *транспортной РНК (мРНК),* а к субъединицам рибосомы, на которой происходит синтез, присоединяются некоторые вспомогательные белковые факторы. Началом синтеза белка считается тот момент, когда эти компоненты объединяются

в цитоплазме, образуя функциональную рибосому. По мере того как молекула мРНК шаг за шагом продвигается сквозь рибосому, ее нуклеотидная последовательность переводится (транслируется) в соответствующую последовательность аминокислот, в результате чего создается определенная белковая цепь. Однако прежде всего необходимо ответить на вопрос о том, как образуются в клетке различные молекулы РНК.

5.1.1. РНК-полимераза «переписывает» заключенную в ДНК информацию в виде РНК: процесс транскрипции [1]

Синтез РНК на ДНК-матрице называется транскрипцией. В результате транскрипции образуются молекулы мРНК, несущие информацию да

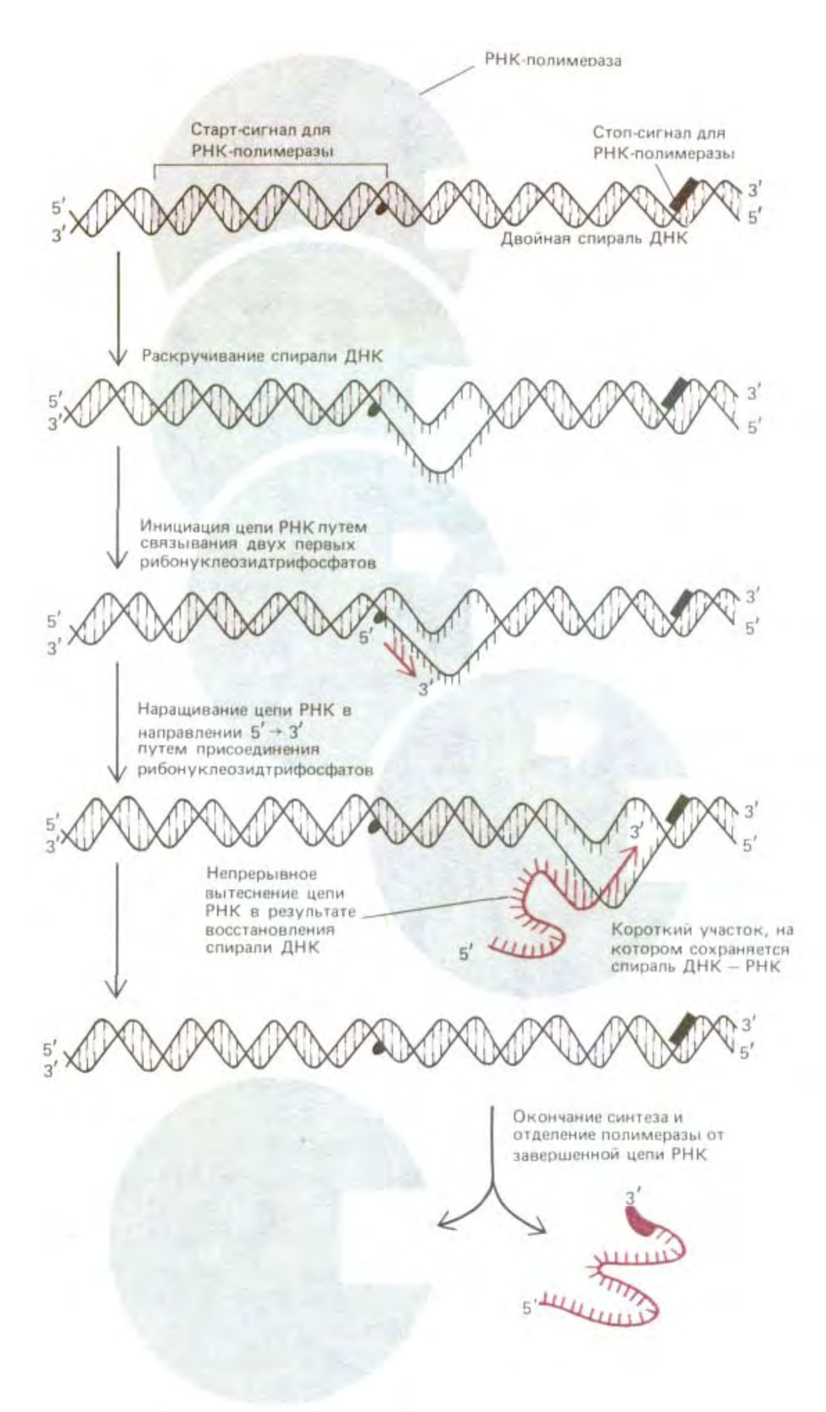


Рис. 5-1. Синтез молекулы РНК, катализируемый РНК-полимеразой. Фермент начинает синтез у специального старт-сигнала в ДНК, называемого промотором, и заканчивает его у стоп-сигнала (сигнал терминации транскрипции), после чего полимераза и синтезированная готовая цепь РНК отделяются друг от друга. Скорость полимеризации при 37°С составляет примерно 30 нуклеотидов в 1 с, поэтому синтез цепи РНК длиной 5000 нуклеотидов длится около 3 мин.

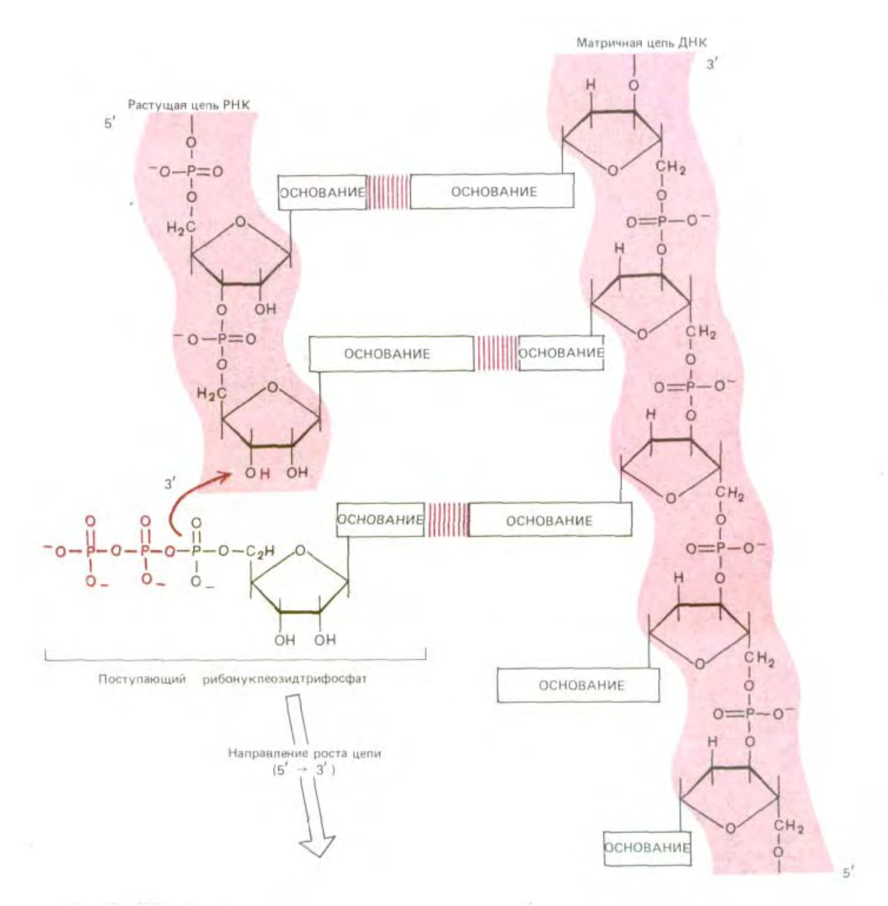


Рис. 5-2. Реакция элонгации, катализируемая ферментом РНК-полимеразой. На каждом этапе из поступающих рибонуклеозидтрифосфатов отбирается один, способный к комплементарному спариванию с открытой матричной цепью ДНК, в результате к растущему 3'-ОН-концу цепи РНК добавляется рибонуклеозидмонофосфат *(цветная стрелка),* а пирофосфат *(выделен цветом)* высвобождается. Таким образом новая цепь РНК растет в направлении 5' → 3' и оказывается комплементарной матричной цепи ДНК. Движущей силой реакции является термодинамически выгодное изменение свободной энергии, сопровождающее высвобождение пирофосфата, и гидролиз пирофосфата до неорганического фосфата. Перемещающаяся вдоль спирали ДНК РНК-полимераза непрерывно раскручивает спираль впереди той точки, где происходит полимеризация, и вновь закручивает ее позади этой точки, высвобождая новосинтезированную цепь РНК. Поэтому небольшой участок РНК-ДНК-спирали (для бактериального фермента - около 17 пар нуклеотидов) существует лишь короткое время. Готовый РНК-продукт высвобождается в виде одно-цепочечной копии одной из двух цепей ДНК.

синтеза белка, а также транспортные, рибосомные и другие виды молекул РНК, выполняющие структурные и каталитические функции. Синтез этих молекул РНК, т. е. синтез РНК-копий нуклеотидных последовательностей тех или иных участков молекулы ДНК, катализируется ферментами, которые называются **РНК-полимеразами.** У эукариот различные виды РНК синтезируются разными РНК-полимеразами, тогда как у прокариот весь синтез РНК осуществляется одним-единственным ферментом этого типа. Почти все, что мы знаем об РНК-полимерах, было выяснено на бактериях.

Бактериальная РНК-полимераза - это крупный, состоящий из нескольких субъединиц фермент, связанный с рядом вспомогательных белковых субъединиц, которые на разных этапах транскрипции присоединяются к комплексу полимераза-ДНК, а затем покидают его (см. разд. 9.4.1). Свободные молекулы РНК-полимеразы, сталкиваясь с хромосомой случайным образом, присоединяются к большинству участков ДНК весьма непрочно. Однако эта связь оказывается очень прочной, если РНК-полимераза присоединяется к специфической последовательности ДНК, к так называемому **промотору,** содержащему *старт-сигнал* для синтеза РНК, т. е. к сайту, с которого этот синтез должен начаться. Реакции, которые за этим следуют, показаны на рис. 5.1. Присоединившись к промотору, РНК-полимераза раскручивает определенный участок двойной спирали, обнажая таким образом нуклеотиды на коротком отрезке каждой из двух цепей ДНК. Одна из этих двух разделенных цепей должна теперь служить матрицей для

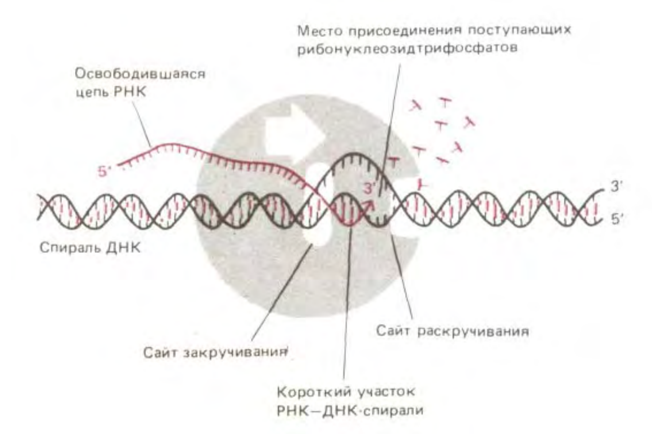


Рис. 5-3. Перемещающаяся вдоль спирали ДНК РНК-полимераза непрерывно раскручивает спираль впереди той точки, где происходит полимеризация, и вновь закручивает ее позади этой точки, высвобождая новосинтезированную цепь РНК. Поэтому небольшой участок РНК-ДНК-спирали (для бактериального фермента — около 17 пар нуклеотидов) существует лишь короткое время. Готовый РНК-продукт высвобождается в виде одноцепочечной копии одной из двух цепей ДНК.

комплементарного спаривания оснований ДНК с основаниями поступающих мономеров - рибонуклеозидтрифосфатов; полимераза соединяет между собой два первых поступающих мономера и тем самым кладет начало синтезируемой цепи РНК. Затем РНК-полимераза, продвигаясь шаг за шагом вдоль ДНК, раскручивает перед собой спираль ДНК, обнажая всякий раз новый участок матрицы для комплементарного спаривания оснований. Таким путем, добавляя к растущей цепи РНК по одному нуклеотиду, она постепенно наращивает эту цепь в направлении 5' → 3' (рис. 5-2). Процесс удлинения цепи РНК продолжается до тех пор, пока фермент не встретит на своем пути еще одну специфическую нуклеотидную последовательность в цепи ДНК, а именно сигнал **терминации транскрипции** (стоп-сигнал). Достигнув этой точки, полимераза отделяется и от матричной ДНК, и от новосинтезированной цепи РНК (см. также рис. 5-6, 6).

Во время продвижения фермента вдоль матричной цепи в его активном центре образуется двойная спираль РНК-ДНК. Она очень коротка, так как позади молекулы полимеразы немедленно восстанавливается спираль ДНК-ДНК, а РНК вытесняется (рис. 5-3). Поэтому каждая завершенная цепь РНК отделяется от ДНК-матрицы в виде свободной одноцепочечной молекулы, в которой число нуклеотидов колеблется обычно от 70 до 10000.

5.1.2. Промоторная последовательность определяет, какая именно цепь ДНК будет транскрибироваться [2]

В принципе любой участок ДНК может быть транскрибирован с образованием двух различных молекул мРНК - по одному на каждую из двух цепей двойной спирали ДНК. В действительности же в любом участке ДНК транскрибируется только одна из двух цепей, так как образовавшаяся РНК соответствует по своей нуклеотидной последовательности другой, нематричной цепи ДНК. Какая из двух цепей будет транскрибироваться, определяется промотором, нуклеотидная последовательность которого ориентирована таким образом, чтобы направить РНК-полимеразу на тот или иной путь. Поскольку цепи РНК растут лишь в направлении 5' → 3', именно от промотора зависит выбор цепи ДНК для транскрипции (рис. 5-4). У двух соседних генов нередко транскрибируются разные цепи ДНК, как это можно видеть на рис. 5-5, где изображен небольшой участок хромосомы.

Анализ (см. разд. 4.6.6) показывает, что РНК-полимераза *E. coli,* присоединяясь к промотору, охватывает довольно большой участок

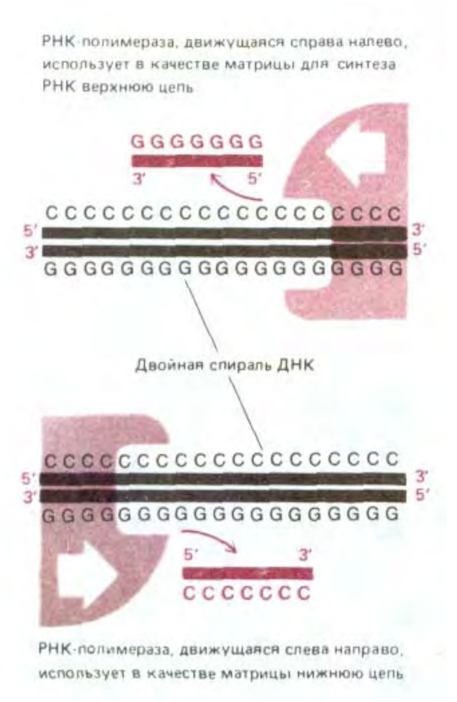


Рис. 5-4. Поскольку цепь ДНК, выполняющая функцию матрицы, должна считываться от 3'-конца к 5'-концу (см. рис. 5-2), выбор одной из двух цепей ДНК на роль матрицы для синтеза РНК определяется направлением движения РНК-полимеразы. В свою очередь направление движения РНК-полимеразы задается ориентацией нуклеотидной последовательности промотора, с которого РНК-полимераза начинает считывание.

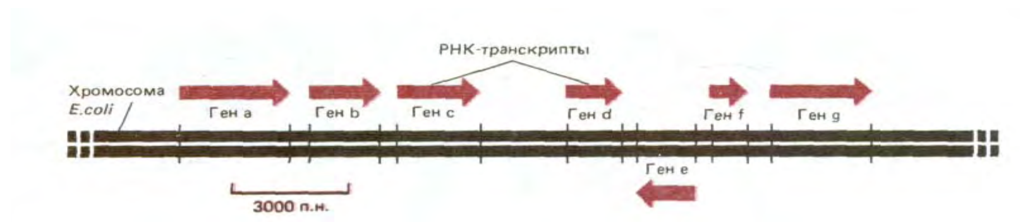


Рис. 5-5. Короткий участок типичной бактериальной хромосомы. Схема показывает, каким образом происходит транскрипция ДНК, связанная с экспрессией нескольких соседних генов.

ДНК: примерно 40 нуклеотидов «вверх» и 20 нуклеотидов «вниз» от старт-сигнала, т. е. от места начала транскрипции. Сравнение многих последовательностей ДНК, играющих роль сильных промоторов для этой полимеразы, показало, что она узнает в молекуле ДНК в первую очередь две строго определенные (консервативные) шестинуклеотидные последовательности, расположенные выше старт-сигнала и отделенные одна от другой приблизительно 17 нуклеотидами (рис. 5-6, Л). Такие консервативные последовательности, обнаруживаемые во всех образцах определенного типа регуляторных участков ДНК, носят название *консенсусных последовательностей* (consensus sequences). В результате сравнения многих промоторов *E. coli* были выявлены две консенсусные шестинуклеотидные последовательности: $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{95}$ и $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$ (цифры показывают ожидаемую частоту (в процентах), с которой данный нуклеотид встречается в указанном положении последовательности: 100 означает, что он присутствует здесь всегда, а 25, что из четырех промоторов он встречается в одном). Последовательности сильных промоторов, как правило, довольно близки к этим двум консенсусным последовательностям, у слабых же промоторов (связанных с генами, продуцирующими сравнительно мало мРНК) это сходство менее выражено.

Клетки эукариот содержат три разные РНК-полимеразы. Одна из них

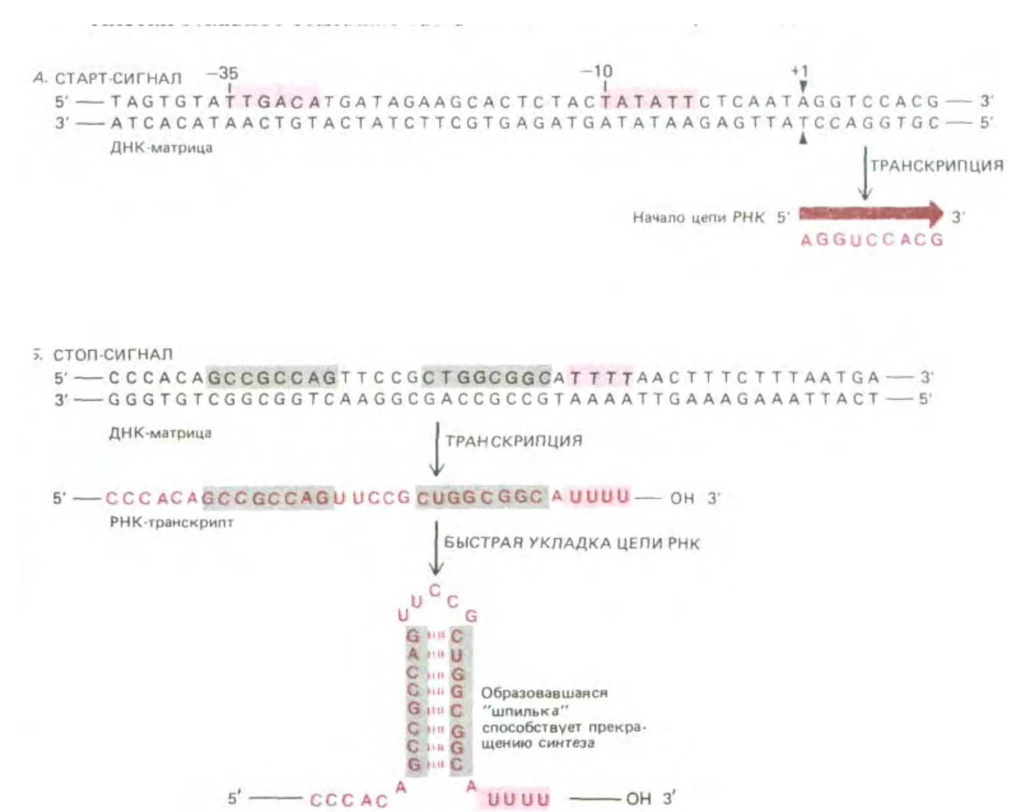


Рис. 5-6. Старт- и стоп-сигналы для РНК-полимеразы, осуществляющей синтез РНК у *E. coli,* Обратите внимание, что матричной цепью служит нижняя цепь ДНК, верхняя же по своей нуклеотидной последовательности соответствует синтезированной РНК (за исключением того, что вместо Т, присутствующего в ДНК, в РНК стоит U). Принято указывать нуклеотидную последовательность применительно к нематричной цепи. *А.* Полимераза начинает синтез у промоторной нуклеотидной последовательности. Считается, что прикрепление полимеразы определяют два коротких участка *(выделены красным),* отстоящие от начала синтеза РНК приблизительно на 35 и 10 нуклеотидов, вместе с точкой начала синтеза эти последовательности образуют промотор. Сколько-нибудь значительные модификации в любой из них ведут к утрате промоторной активности, изменения в других участках цепи ДНК такого эффекта не вызывают. *Б.* Полимераза прекращает синтез, после того как будет синтезирован участок из нескольких остатков U (что соответствует нескольким А на матрице) и самокомплементарная нуклеотидная последовательность *(выделена серым).* Соответствующее сочетание нуклеотидных последовательностей в ДНК служит стоп-сигналом. Порядок нуклеотидов в самокомплементарной последовательности может быть различным, решающим для прекращения транскрипции является быстрое образование в этом участке новосинтезированной РНК двойной спирали - так называемой шпильки.

катализирует синтез всех РНК, кодирующих белок (т.е. мРНК), тогда как две другие синтезируют молекулы РНК, выполняющие структурные или каталитические функции (например, рибосомные и транспортные РНК). Все три РНК-полимеразы представляют собой крупные мультимерные молекулы, напоминающие бактериальный фермент, но промоторы, которые они узнают, сложнее по своему строению и пока еще не столь хорошо изучены (см. разд. 9.4.3). Неясно, почему столь сложны молекулы и бактериальной РНК-полимеразы, и РНК-полимеразы эукариот. Эти молекулы состоят из нескольких субъединиц с общей массой свыше 500 000 дальтон. Между тем известно, что РНК-полимеразы некоторых бактериофагов, состоящие из одной цепи и имеющие впятеро меньшую массу, катализируют синтез РНК не менее эффективно, чем соответствующий фермент клетки-хозяина. Можно предположить, что мультимерное строение клеточных РНК-полимераз имеет какое-то отношение к регуляторным аспектам клеточного синтеза РНК, пока еще недостаточно хорошо выясненным.

В приведенном выше описании **транскрипции ДНК** опущены многие подробности; обычно синтез молекулы мРНК включает и ряд других сложных этапов. Известно, например, что в определении того, какие участки ДНК будут транскрибироваться РНК-полимеразой, важную роль играют особые белки, регулирующие активность генов, а значит, именно от них в первую очередь и зависит, какие белки будет вырабатывать клетка. Далее, в то время как у прокариот молекулы мРНК образуются непосредственно путем транскрипции ДНК, в клетках высших эукариот большинство РНК-транскриптов, прежде чем покинуть клеточное ядро и перейти в цитоплазму в виде мРНК, претерпевает существенные изменения - подвергается сплайсингу. Все эти аспекты процесса образования мРНК мы обсудим в гл. 9 и 10, где речь пойдет о клеточном ядре и о регуляции экспрессии генов. Здесь же мы просто будем исходить из того, что в клетке так или иначе образуются функциональные молекулы мРНК, и познакомимся с тем, как они направляют белковый синтез.

5.1.3. Молекулы транспортных РНК служат адаптерами, переводящими нуклеотидные последовательности в аминокислотные [3]

Во всех клетках имеется набор транспортных РНК (тРНК)- небольших молекул, размеры которых колеблются от 70 до 90 нуклеотидов. Эти РНК, присоединяясь одним своим концом к специфическому кодону мРНК, а другим присоединяя аминокислоту, кодируемую данным триплетом, позволяют аминокислотам выстраиваться в порядке, диктуемом нуклеотидной последовательностью мРНК. Каждая тРНК может переносить только одну из 20 аминокислот, используемых в синтезе белка. Транспортную РНК, переносящую глицин, обозначают $тРНК^{Gly}$ и т. д. Для каждой из 20 аминокислот имеется по меньшей мере один тип тРНК, для большей же части аминокислот их имеется несколько. Прежде чем включиться в синтезируемую белковую цепь, аминокислота присоединяется своим карбоксильным концом к 3'-концу соответствующей молекулы тРНК. Этим достигаются две цели. Во-первых, и это наиболее важно, аминокислота ковалентно присоединяется к тРНК, содержащей правильный антикодон - трехнуклеотидную последовательность, комплементарную трехнуклеотидному кодону, определяющему эту аминокислоту в молекуле мРНК. Спаривание кодона с антикодоном позволяет каждой аминокислоте включиться в растущую белковую цепь в том порядке, который диктуется нуклеотидной последовательностью мРНК, так что генетический код используется для перевода (трансляции)

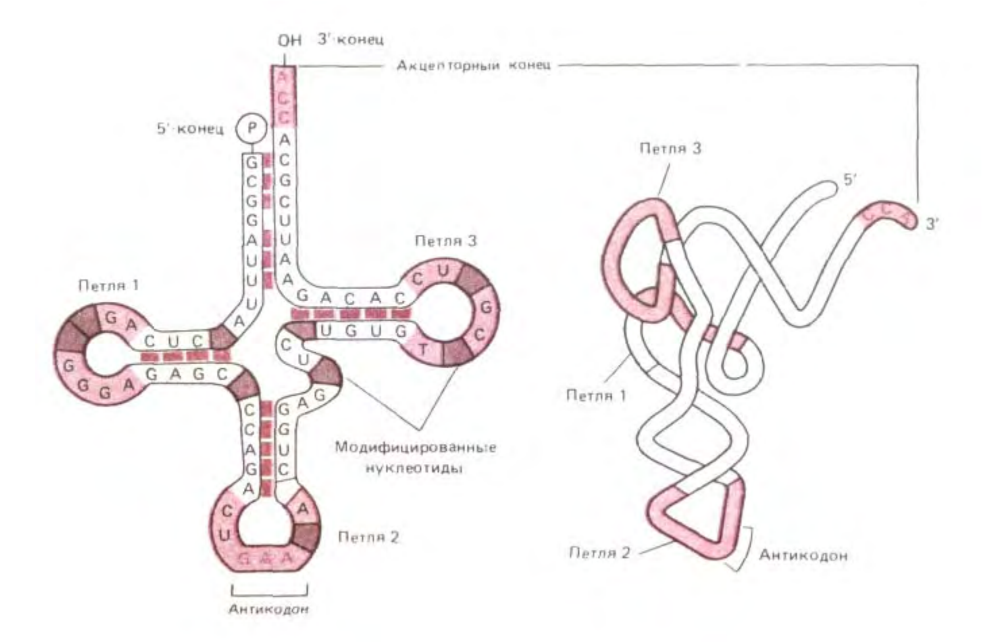


Рис. 5-7. Строение типичной молекулы тРНК. Слева представлен механизм спаривания оснований в соответствующих участках молекулы (структура «клеверного листа»), а справа - общая трехмерная информация молекулы, установленная с помощью дифракции рентгеновских лучей. Отметим, что молекула напоминает по форме букву L, один ее конец (акцепторный) предназначен для присоединения аминокислоты, а второй содержит антикодон, состоящий из трех нуклеотидов. Аминокислота присоединяется к остатку А последовательности ССА на 3'-конце молекулы (см. рис. 5-11).

нуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот в аминокислотные последовательности белков. В этом заключается важная «адапторная» функция тРНК: присоединяясь одним концом к аминокислоте, а другим спариваясь с кодоном, тРНК переводит последовательность нуклеотидов в последовательность аминокислот.

Вторая цель, достигаемая присоединением аминокислоты к тРНК, заключается в том, что аминокислота таким путем активируется - на ее карбоксильном конце возникает богатая энергией связь, что дает ей возможность реагировать с аминогруппой соседней аминокислоты в данной аминокислотной последовательности, т, е. возможность образовать пептидную связь. Этот процесс активации - необходимый этап белкового синтеза, поскольку неактивированные аминокислоты не могут прямо присоединяться к растущей полипептидной цепи. (Спонтанно способен идти лишь обратный процесс - гидролитический разрыв пептидных связей.)

Функция тРНК зависит от трехмерной структуры ее молекулы. Несколько видов тРНК удалось получить в кристаллическом виде, что позволило определить их точную структуру методом рентгеноструктурного анализа. Для надлежащего свертывания молекулы тРНК требуется комплементарное спаривание оснований и взаимодействие необычных оснований (см. разд. 3.2.9, рис. 3-16). Изучение вторичной структуры молекулы тРНК из многих различных организмов показало, что она имеет вид «клеверного листа»; полагают, что петли и прямолинейные отрезки этой структуры затем свертываются дополнительно, вследствие чего возникает обнаруживаемая кристаллографическим анализом L-кон-формация (рис. 5-7). К одному концу этой «буквы» присоединяется аминокислота, а на другом конце находится антикодон (рис. 5-8).

В готовой цепи нуклеиновой кислоты нуклеотиды (подобно аминокислотам в белках) могут претерпевать ковалентную модификацию, приводящую к изменению активности данной нуклеиновой кислоты. Такие посттранскрипционные модификации особенно свойственны молекулам тРНК, в которых обнаруживается много модифицированных нуклеотидов (рис. 5-9). Некоторые из них оказывают влияние на конформацию и на спаривание оснований антикодона, что облегчает узнавание соответствующего кодона мРНК молекулой тРНК.

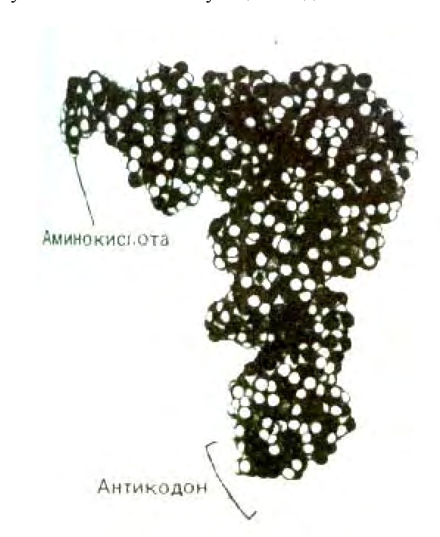


Рис. 5-8. Пространственная модель молекулы тРНК с присоединенной аминокислотой. Существует много различных видов тРНК - не менее одного на каждую аминокислоту. Хотя эти молекулы тРНК различаются по своей нуклеотидной последовательности, все они свернуты сходным образом. Изображенная здесь молекула тРНК связывает аминокислоту фенилаланин, поэтому ее условно обозначают $тРНК^{Phe}$. (С любезного разрешения Sung-Hou Kim.)

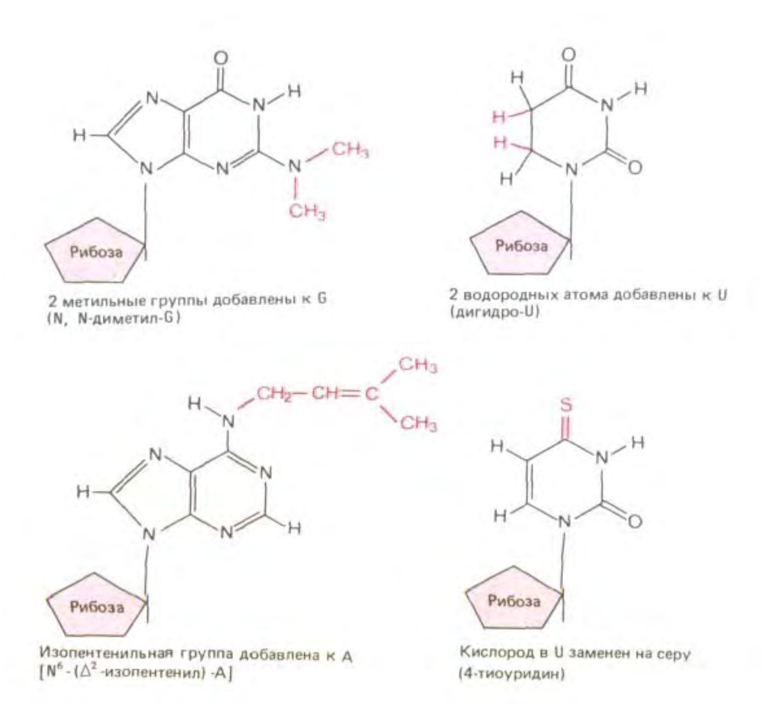


Рис. 5-9. Некоторые необычные нуклеотиды, встречающиеся в молекулах тРНК. Они возникают в результате ковалентной модификации обычного нуклеотида уже после того, как он включился в полинуклеотидную цепь. В большинстве молекул тРНК подобным образом видоизменено приблизительно 10% нуклеотидов (см. рис. 5-7).

5.1.4. Каждая аминокислота присоединяется к соответствующей молекуле тРНК при помощи специфического фермента [4]

В каком именно месте будет присоединена к растущей полипептидной цепи данная аминокислота, зависит не от самой аминокислоты, а от присоединившей ее молекулы тРНК. Выяснить это удалось при помощи изящного эксперимента, в котором аминокислоту, присоединенную к специфической тРНК, химическим путем превращали в другую аминокислоту (цистеин в аланин). Когда затем такие гибридные молекулы участвовали в синтезе белка в бесклеточной системе, неправильная аминокислота включалась в белковую цепь во всех тех положениях, которые «обслуживались» данной тРНК. Успешное декодирование, следовательно, решающим образом зависит от точности того механизма, который в норме обеспечивает связь между каждой активированной аминокислотой и соответствующей молекулой тРНК.

Почему молекула тРНК ковалентно присоединяется именно к той аминокислоте из всех двадцати стандартных аминокислот, которая и является ее настоящим партнером? Механизм этот связан *с* участием ферментов, называемых аминоацил-тРНК-синтетазами, которые присоединяют каждую аминокислоту к соответствующему набору молекул тРНК. Для каждой из аминокислот имеется своя особая синтетаза (всего таких синтетаз 20): одна присоединяет глицин к $тРНК^{Gly}$, другая - аланин к $тРНК^{Ala}$ и т. д. Реакция присоединения протекает в два этапа, как это видно на рис. 5-10, и приводит к образованию молекулы аминоацил-тРНК. Характер связи аминоацил-тРНК ясен из рис. 5-11.

Молекулы тРНК играют роль конечных «адапторов», переводящих информацию, заключенную в нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты, на язык белка. Не менее важную роль, однако, играет и второй набор молекул - ферментов аминоацил-тРНК-синтетаз. Таким образом, генетический код расшифровывается при помощи двух последовательно действующих посредников, каждый из которых осуществляет высокоспецифическую подгонку одной молекулярной поверхности к другой; в результате совместного действия этих адап-

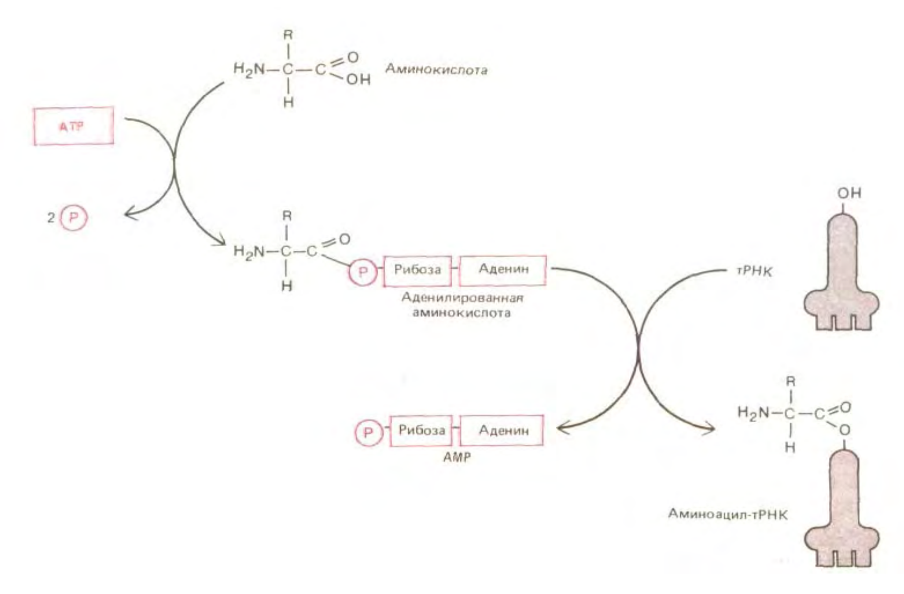


Рис. 5-10. Двухэтапный процесс, в котором аминокислота под действием аминоацил-тРНК-синтетазы переводится в активированную форму, вовлекаемую в синтез белка. Для присоединения каждой аминокислоты к соответствующей молекуле тРНК используется, как здесь показано, энергия гидролиза АТР, поскольку возникающая связь принадлежит к числу богатых энергией. Сначала аминокислота активируется путем связывания ее карбоксильной группы непосредственно с АМР, т. е. образуется а*денилированная аминокислота;* источником энергии для реакции аденилирования, в обычных условиях невыгодной в термодинамическом смысле, служит гидролиз АТР (играющего роль донора АМР). Оставаясь связанной с аминоацил-тРНК-синтетазой, аденилированная карбоксильная группа аминокислоты переносится затем на гидроксильную группу аминокислоты остатка сахара, находящуюся на 3'-конце молекулы тРНК. В результате этого переноса образуется молекула аминоацил-тРНК, в которой аминокислота присоединена к тРНК активированной сложноэфирной связью.

торных молекул каждая аминокислота может быть отождествлена с определенной последовательностью из трех нуклеотидов в молекуле мРНК, иными словами, со своим кодовом (рис. 5-12).

5-6

5.1.5. Аминокислоты присоединяются к карбоксильному концу растущей полипептидной цепи

Основная реакция в синтезе белка - это реакция, приводящая к образованию пептидной связи между карбоксильной группой на конце растущей полипептидной цепи и свободной аминогруппой аминокислоты. Белковая цепь синтезируется, следовательно, путем ее постепенного наращивания от аминного конца к карбоксильному. На протяжении всего процесса растущий карбоксильный конец полипептидной цепи остается

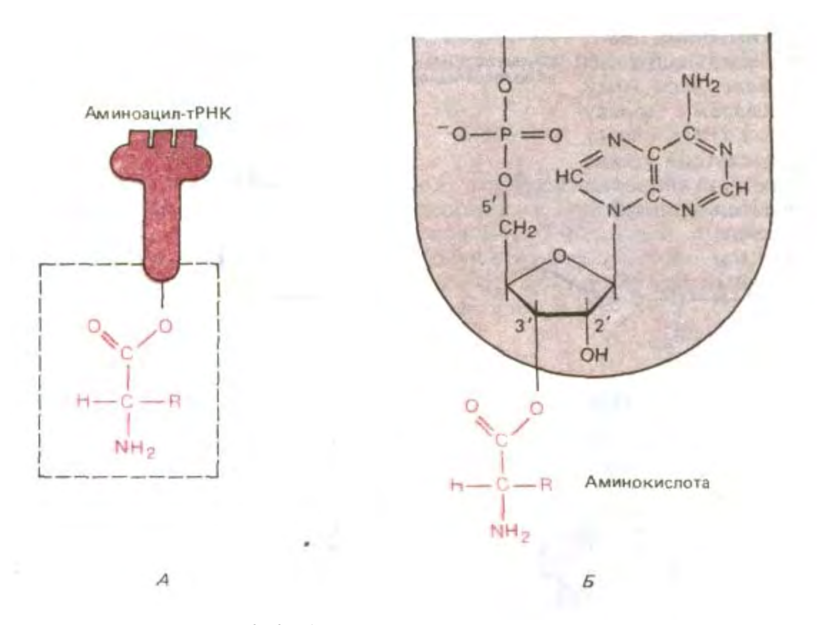


Рис. 5-11. Связь между аминокислотой и тРНК. Карбоксильная группа аминокислоты присоединена сложноэфирной связью к рибозе. Поскольку гидролитический разрыв этой сложноэфирной связи сопровождается термодинамически выгодным изменением свободной энергии, аминокислота, удерживаемая подобной связью, активирована. *А,* Схематическое изображение. *Б.* Реальная структура области, выделенной в левой части рисунка в рамку. R в аминокислотной части молекулы, как и на рис. 5-10, означает одну из 20 возможных боковых цепей.

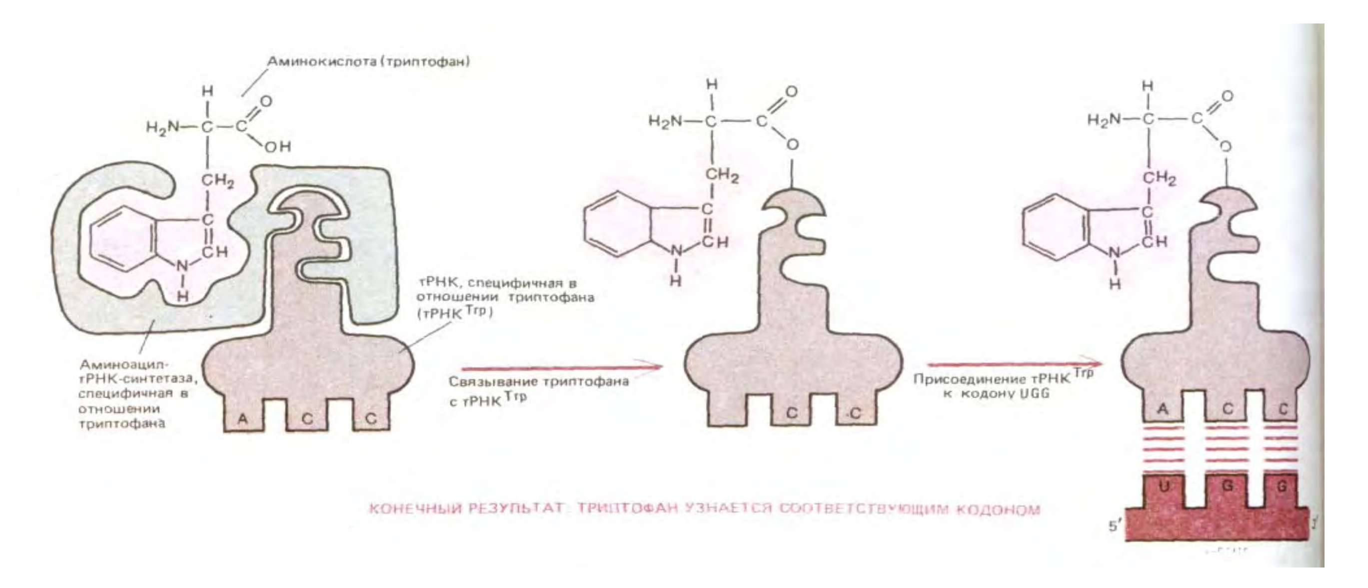


Рис. 5-12. Схема, показывающая, как осуществляется трансляция генетического кода при помощи двух совместно действующих «адапторов»: одним из них является фермент аминоацил-тРНК-синтетаза, присоединяющий данную аминокислоту к соответствующей тРНК, а вторым - молекула тРНК, которая связывается затем с надлежащей нуклеотидной последовательностью в мРНК.

в активированном состоянии, будучи связан ковалентной связью с тРНК (в молекуле *пептидил-тРНК).* В каждом цикле синтеза происходит разрыв этой ковалентной связи, однако она тут же замещается точно такой же связью, образуемой следующей присоединенной к цепи аминокислотой (рис. 5-13). Таким образом, в процессе синтеза белка каждая добавляемая аминокислота несет с собой энергию активации, необходимую не для ее собственного присоединения, а для присоединения следующей аминокислоты. Это один из примеров «роста с головы», описанного в гл. 2 (рис. 2-34).

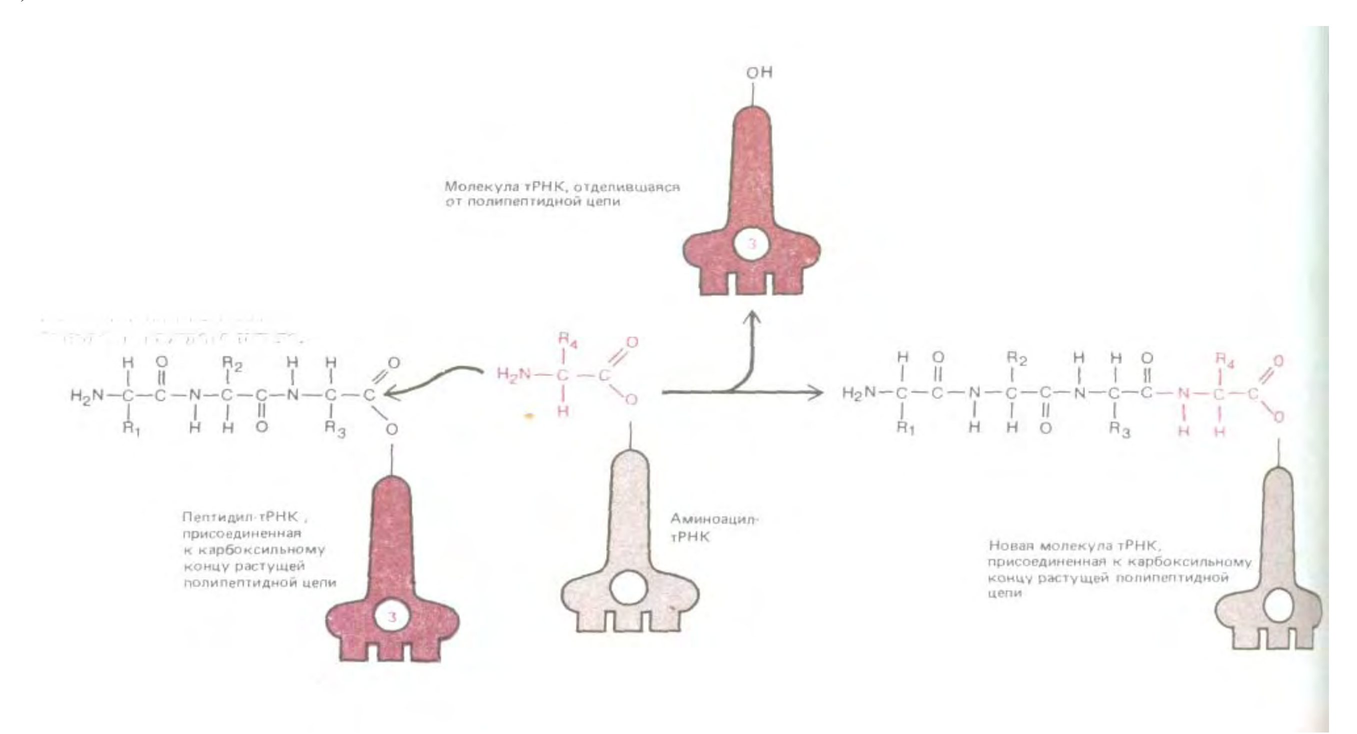


Рис. 5-13. Полипептидная цепь растет путем последовательного добавления новых аминокислот к ее карбоксильному концу. Образование каждой пептидной связи в энергетическом смысле выгодно, так как растущий карбоксильный конец цепи активирован благодаря тому, что он ковалентно связан с молекулой тРНК. Пептидил-тРНК-связь, поддерживающая растущий конец полипептидной цепи в активированном состоянии, восстанавливается заново в каждом цикле.

5-3

5.1.6. Генетический код вырожден [5]

В процессе синтеза белка нуклеотидная последовательность мРНК считывается группами по три нуклеотида, по мере того как считывающий «аппарат» перемещается вдоль молекулы мРНК в направлении 5' → 3'. Каждая аминокислота соответствует определенному триплету нуклеотидов **(кодону)** в молекуле мРНК, который спаривается с последовательностью из трех комплементарных нуклеотидов в антикодоновой петле определенной молекулы тРНК. Поскольку спариваться с данным кодовом способен только один из многих различных видов молекул клеточной тРНК, выбор аминокислоты, присоединяемой в каждый данный момент к растущему концу полипептидной цепи, определяется кодовом (рис. 5-14).

Число возможных сочетаний трех нуклеотидов четырех типов равно 64 (4 x 4 x 4). Большинство этих сочетаний действительно встречается почти во всех молекулах мРНК. Три кодона из шестидесяти четырех не кодируют никаких аминокислот; эти кодоны определяют собой прекращение (терминацию) синтеза полипептидной цепи, и потому их называют *стоп-кодонами* или терминирующими кодонами. Остается, таким образом, 61 кодон, тогда как число различных встречающихся в белках аминокислот равно только 20. Отсюда следует, что большая часть аминокислот представлена более чем одним кодоном. Поэтому генетический код называют *вырожденным.* Для двух аминокислот, метионина и триптофана, имеется лишь по одному кодону; именно эти аминокислоты встречаются в белках реже всего.

Вырожденность генетического кода можно истолковывать двояко: 1) для каждой аминокислоты имеется более одной тРНК и 2) каждая молекула тРНК может спариваться более чем с одним кодоном. В действительности справедливо и то и другое. Для некоторых аминокислот существует более одной тРНК. Кроме того, некоторые тРНК таковы, что требуют точного спаривания только по первым двум положениям кодона; в третьем же положении допускается и неверное спаривание (так называемое неоднозначное соответствие). Этим объясняется, почему многие альтернативные кодоны аминокислот различаются лишь по своему третьему нуклеотиду (рис. 5-15). Спаривание при неоднозначном соответствии позволяет «привязать» 20 аминокислот к 61 кодону при наличии всего 31 вида тРНК; в митохондриях животных неоднозначное соответствие выражено еще более резко и здесь для синтеза белка оказывается достаточно 22 видов тРНК (см. разд. 7.5.5).

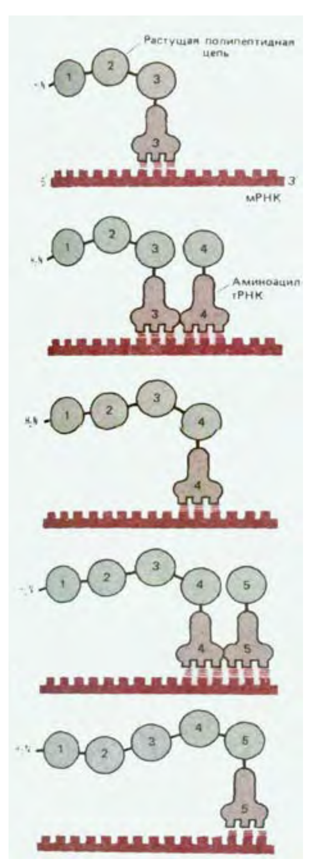


Рис. 5-14. Выбор каждой аминокислоты, добавляемой к растущему концу полипептидной цепи, определяется комплементарным спариванием оснований между антикодоном присоединившей аминокислоту тРНК и очередным кодоном цепи мРНК.

GCA GCC GCG GCU	AGA AGG CGA CGC CGG CGU	GAC GAU	AAC AAU	UGC UGU	GAA GAG	CAA CAG	GGA GGC GGG GGU	CAC CAU	AUA AUC AUU	UUA UUG CUA CUC CUG CUU	AAA AAG	AUG	UUC UUU	CCA CCC CCG CCU	AGC AGU UCA UCC UCG UCU	ACA ACC ACG ACU	UGG	UAC UAU	GUA GUC GUG GUU	UAA UAG UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ileu	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Стоп
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

Рис. 5-15. Генетический код. Под трехбуквенным обозначением каждой аминокислоты дано общепринятое однобуквенное обозначение. При таком изображении кодонов 5'-концевой нуклеотид находится слева. Отметим, что почти все аминокислоты представлены более чем одним кодоном и что изменения затрагивают в основном третий кодон (см. также рис. 3-15).

5.1.7. Реакции синтеза белка протекают на рибосомах [6]

Для осуществления реакций белкового синтеза, которые мы только что описали, требуется сложный каталитический аппарат. Растущий конец полипептидной цепи должен, например, определенным образом подстраиваться к молекуле мРНК, для того чтобы каждый последующий кодон мРНК мог точно соединиться с антикодоном тРНК, не проскочив ни на один нуклеотид, ибо это привело бы к сдвигу рамки считывания (см. разд. 3.2.8). Эти и другие этапы белкового синтеза осуществляются рибосомами - крупными комплексами, состоящими из молекул белков и РНК. Рибосомы эукариот и прокариот очень сходны по своей структуре и функции. Каждая из них состоит из двух субъединиц - большой и малой, образующих в совокупности комплекс с массой в

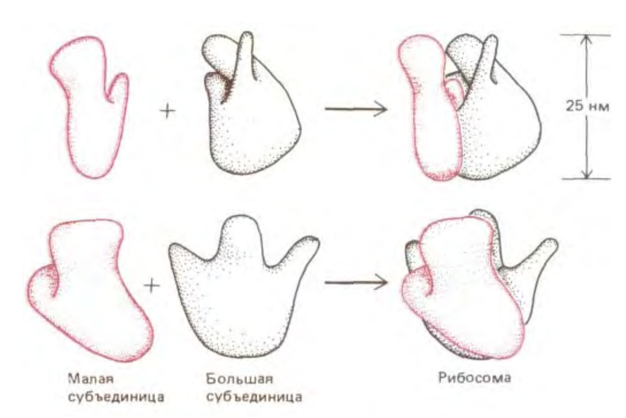


Рис. 5-16. Трехмерная модель бактериальной рибосомы (вид с двух разных сторон). Положение многих рибосомных белков в этой структуре выявлено с помощью электронного микроскопа, позволяющего обнаружить места прикрепления специфических антител, а также по рассеянию нейтронов от рибосом, содержащих один или несколько дейтерированных белков. (По J. A. Lake, Ann. Rev. Biochem., 54, 507-530, 1985.)

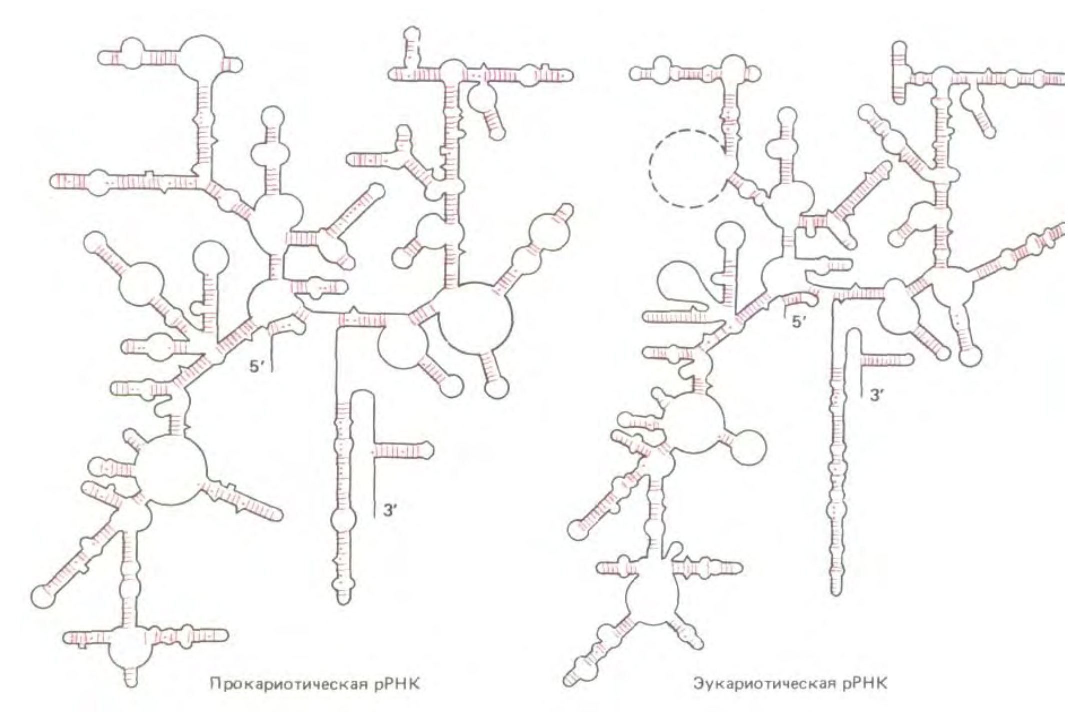


Рис. 5-17. Сложное расположение петель и спаренных прямых участков в трехмерной структуре 16S-рРНК *E. coli (A)* и 18S-рРНК дрожжей *(S. cerevisiae) (Б).* В главных чертах такое строение характерно для всех видов рРНК, подобных 16S-рРНК, в том числе и для рРНК архебактерий. Точки обозначают постулированные слабые взаимодействия между основаниями, например в парах G-U. (По R. R. Gutell, B. Weiser, C. R. Woese, H. F. Noller, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 32, 155-216, 1985.)

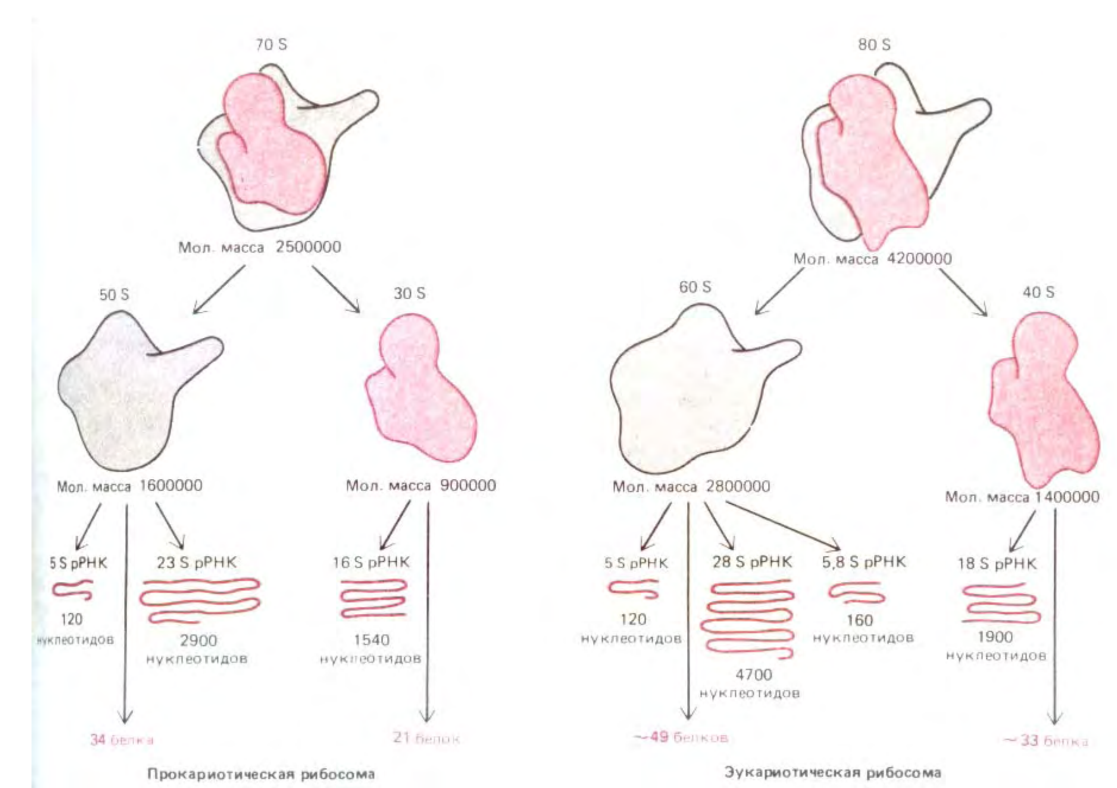


Рис. 5-18

с. 5-18. Сравнение структуры кариотических и эукариотичес- рибосом. Для обозначения личных компонентов рибосом льзуется величина S, характе- ющая скорость их оседания ьтрацентрифуге. Отметим, что мотря на различия в числе змерах белковых и нуклеиново- отных компонентов прокарио- ских и эукариотических рибо- они чрезвычайно близки по й структуре и функционируют сходным образом. Например, я 28S-рРНК эукариотической сомы содержат большое число лнительных нуклеотидов, по нению с бактериальной рибосо- однако эти нуклеотиды при- вуют здесь в виде многочис- х вставок, практически не щих основную структуру рРНК (см. рис. 5-17).

несколько миллионов дальтон (рис. 5-16). Малая субъединица удерживает мРНК и тРНК, а большая катализирует образование пептидной связи.

Более половины массы рибосомы составляет РНК, и накапливается все больше данных, указывающих, что именно **рибосомная РНК (рРНК)** играет ключевую роль в каталитической активности рибосомы. Размеры молекул рРНК в малой рибосомной субъединице у разных организмов варьируют, но сложная ее структура остается весьма постоянной (рис. 5-17); между молекулами рРНК больших рибосомных субъединиц также выявляется у разных организмов высокая степень гомологии. В состав рибосомы входит значительное число белков (рис. 5-18), но их аминокислотные последовательности на протяжении эволюции довольно сильно менялись. Удивление вызывает тот факт, что многие из этих белков для функционирования рибосом, по-видимому, не являются необходимыми. Можно предположить (ниже мы останавливаемся на этом подробнее; см. разд. 5.1.16), что рибосомные белки нужны в основном для усиления функции рРНК и что не белковые молекулы, а молекулы РНК катализируют многие из реакций, протекающих на рибосомах.

5.1.8. Рибосома продвигается шаг за шагом вдоль цепи мРНК [6, 7]

В рибосоме имеются три различных участка, с которыми связывается РНК, - один для мРНК и два для тРНК. Из двух последних один участок удерживает молекулу тРНК, присоединенную к растущему концу полипептидной цепи (поэтому его называют **пептидил-тРНК-связывающим участком** или **Р-участком),** а второй служит для удержания только

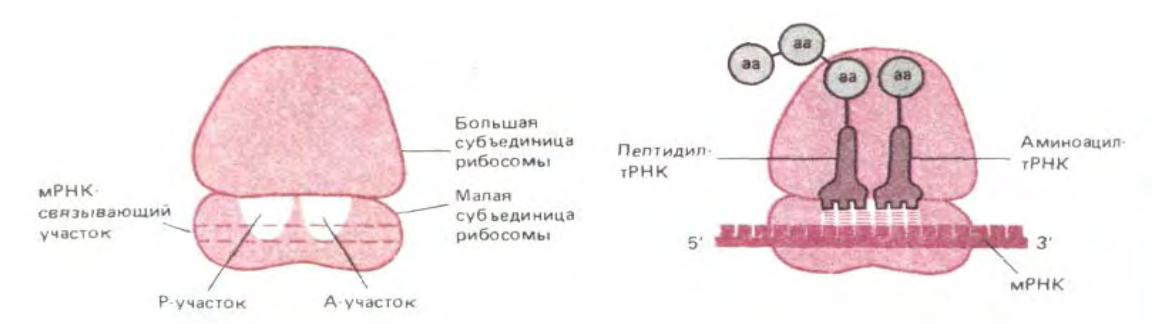


Рис. 5-19. Три главных участка связывания, в которых молекулы РНК присоединяются к рибосоме. Слева представлена ненагруженная рибосома, справа - нагруженная. На этом рисунке так же, как и на трех следующих, рибосомы изображены схематично, более точное представление об их форме дают рис. 5-16 *к 5-23.*

что прибывшей молекулы тРНК, нагруженной аминокислотой; называют **аминоацил-тРНК-связывающим участком** или **А-участком.** К обоим участкам молекула тРНК прочно прикрепляется лишь в случае, если ее антикодон спаривается с комплементарным ему ко, мРНК. А- и Р-участки располагаются очень близко друг к другу, так что две связанные с ними молекулы тРНК спариваются с двумя соседними кодонами в молекуле мРНК (рис. 5-19).

Процесс наращивания (элонгации) полипептидной цепи на рибосомах может рассматриваться как цикл, слагающийся из трех отдельных этапов (рис. 5-20). На первом этапе молекула аминоацил-тРНК связывается со свободным участком рибосомы, примыкающим к занятому Р-участку. Связывание осуществляется путем спаривания нуклеотидов антикодона с тремя нуклеотидами мРНК, находящимися в А-участке На втором этапе карбоксильный конец полипептидной цепи отделяется в Р-участке от молекулы тРНК и образует пептидную связь с аминокислотой, присоединенной к молекуле тРНК в А-участке. Эта реакция катализируется **пептидилтрансферазой -** ферментом, активность которой зависит от целостности рибосомы, а также, как полагают, от участка некоторой специфической области в главной молекуле рРНК большой субъединицы рибосомы. На третьем этапе новая пептидил-тРНК переносится в Р-участок рибосомы, в то время как рибосома продвигается вдоль молекулы мРНК ровно на три нуклеотида. Этот этап требует затраты энергии; движущей силой служит для него ряд конформационных изменений, индуцируемых в одном из компонентов рибосом гидролизом связанной с ним молекулы GTP (см. разд. 3.4.11).

Процесс транслокации, составляющий третий этап, включает в себя и возвращение свободной молекулы тРНК, отделившейся от полипептидной цепи в Р-участке во время второго этапа, в цитоплазматический пул тРНК. Поэтому после завершения третьего этапа незаняты А-участок может принять новую молекулу тРНК, нагруженную очередной аминокислотой, т. е. цикл может начаться снова. В бактериальной клетке продолжительность одного цикла элонгации полипептидной составляет при оптимальных условиях около 1/20 с, так что синтез среднего по размерам белка, состоящего из 400 аминокислот, занимает приблизительно 20 с. Рибосомы продвигаются вдоль молекулы мРНК в направлении 5' → 3', т. е. в том же направлении, в каком идет синтез РНК (см. рис. 5-2).

В большей части клеток синтез белка - самый энергоемкий из всех биосинтетических процессов. Образование каждой новой пептидной связи сопровождается расщеплением по меньшей мере четырех высоко энергетических фосфатных связей. Две из них расходуются на то, чтобы нагрузить аминокислотой молекулу тРНК (см. рис. 5-10), а две - на сам синтез в цикле реакций, протекающих на рибосоме: при связывании аминоацил-тРНК на первом этапе цикла и при транслокации рибосомы на третьем этапе.

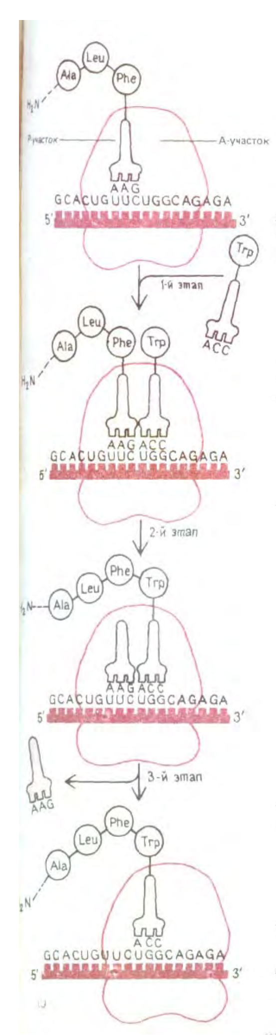


Рис. 5-20. Фаза элонгации в синтезе белка, протекающая на рибосоме. Представленный здесь трехэтапный цикл многократно повторяется во время синтеза белковой цепи. На первом этапе молекула аминоацил-тРНК присоединяется к А-участку рибосомы, второй этап характеризуется образованием новой пептидной связи, на третьем этапе рибосома продвигается вдоль цепи мРНК на расстояние, соответствующее трем нуклеотидам, высвобождая предыдущую молекулу тРНК, т.е. устанавливается в таком положении, чтобы цикл мог повториться сначала.

5-5
5-8

5.1.9. Белковая цепь отделяется от рибосомы, как только она достигает одного из трех терминирующих кодонов [6, 8]

Из 64 возможных кодонов мРНК три, а именно UAA, UAG и UGA, являются терминирующими или **стоп-кодонами:** они останавливают трансляцию. Особые цитоплазматические белки, называемые *факторами освобождения,* непосредственно связываются с любым стоп-кодоном, достигшим А-участка рибосомы. Это связывание изменяет активность пептидилтрансферазы. Фермент с измененной активностью присоединяет теперь к пептидил-тРНК не аминокислоту, а молекулу воды. Вследствие этого карбоксильный конец растущей полипептидной цепи отделяется от молекулы тРНК. А поскольку растущий полипептид удерживается на рибосоме только посредством его связи с молекулой тРНК, завершенная белковая цепь оказывается свободной и, отделившись от рибосомы, немедленно поступает в цитоплазму (рис. 5-21). После этого рибосома освобождает мРНК и распадается на две субъединицы; эти субъединицы могут затем объединиться на другой молекуле мРНК и начать новый цикл белкового синтеза посредством процесса, который мы опишем ниже.

5-4

5.1.10. Рамка считывания матрицы устанавливается в момент инициации синтеза полипептидной цепи [6, 9]

Теоретически нуклеотидная последовательность РНК может быть декодирована с помощью любой из трех различных рамок считывания, причем образующиеся полипептидные цепи будут в этих трех случаях совершенно разными (см. рис. 3-14). Как в действительности пойдет считывание, определяется в тот момент, когда рибосома соединяется с молекулой мРНК. В фазе инициации белкового синтеза сборка рибосомы из двух ее субчастиц на молекуле мРНК происходит в том самом месте, с которого должен начаться синтез полипептидной цепи.

Процесс инициации сложен. Он слагается из ряда этапов, катализируемых белками, которые носят название **факторов инициации (IF);** многие из них сами состоят из нескольких полипептидных цепей. В силу этой сложности инициации многие ее детали до сих пор не вполне выяснены. Известно, однако, что сборка каждой рибосомы на цепи мРНК проходит в два этапа: сначала нагруженная факторами инициации малая субъединица рибосомы находит на мРНК старт-кодон, а затем к ней присоединяется большая субъединица.

Прежде чем рибосома может начать синтез новой полипептидной цепи, к ее Р-участку, обычно удерживающему пептидил-тРНК, должна присоединиться молекула аминоацил-тРНК (рис. 5-22). Для этого требуется особая молекула тРНК, называемая *инициаторной тРНК.* Инициаторная тРНК поставляет аминокислоту, с которой должен начаться синтез полипептидной цепи. Роль этой аминокислоты всегда играет метионин или (у прокариот) его аминоформилированное произ-

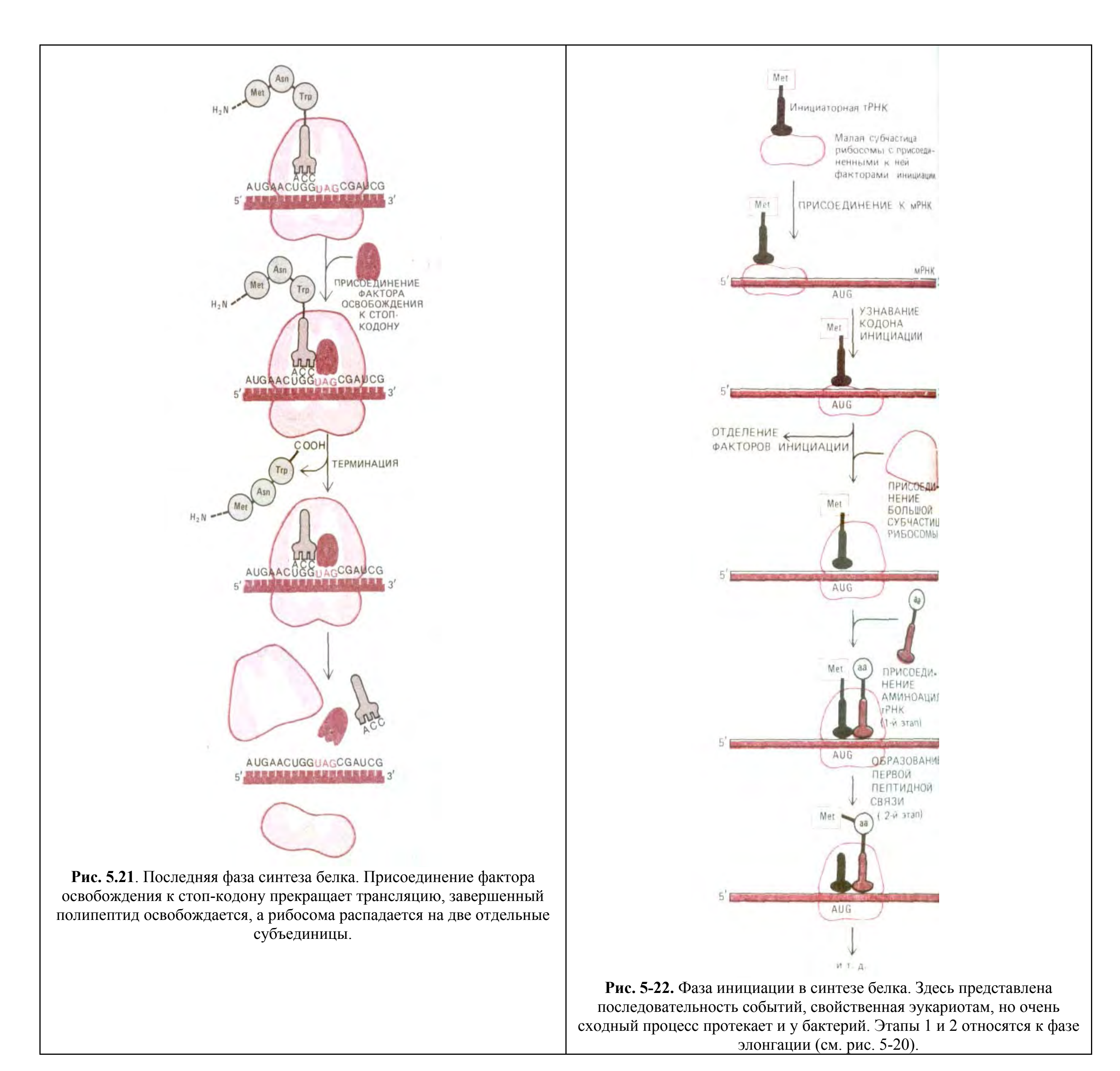


Рис. 5.21. Последняя фаза синтеза белка. Присоединение фактора освобождения к стоп-кодону прекращает трансляцию, завершенный полипептид освобождается, а рибосома распадается на две отдельные субъединицы.

Рис. 5-22. Фаза инициации в синтезе белка. Здесь представлена последовательность событий, свойственная эукариотам, но очень сходный процесс протекает и у бактерий. Этапы 1 и 2 относятся к фазе элонгации (см. рис. 5-20).

водное. У эукариот малая субъединица рибосомы нагружается инициаторной тРНК, прежде чем присоединиться к мРНК. С инициаторш тРНК прочно связывается важный фактор инициации, называемый *эукариотическим фактором инициации 2* (eIF-2); он необходим для того, чтобы инициаторная тРНК заняла правильное положение на малой

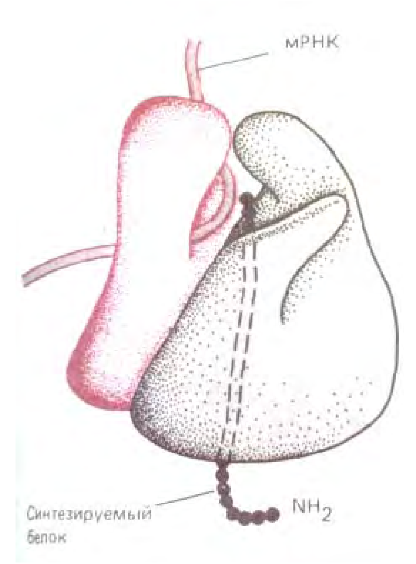


Рис. 5-23. Трехмерная модель функциональной рибосомы бактерий. Малая *(красная)* субъединица и большая *(серая)* образуют комплекс, сквозь который протянута нить мРНК. Точно траектория движения мРНК и наращиваемой полипептидной цепи неизвестны, однако участок, где происходит присоединение аминокислот, указан здесь правильно. (С изменениями по J. A. Lake, Annu. Rev. Biochem., Я 507-530, 1985.)

субъединице рибосомы. В некоторых клетках от этого фактора зависит общая скорость белкового синтеза (см. ниже).

В следующем разделе мы расскажем, как малая субъединица рибосомы помогает присоединенной к ней инициаторной тРНК отыскать на молекуле мРНК среди всех встречающихся здесь кодонов AUG один особый кодон (старт-кодон). Как только это произойдет, несколько факторов инициации, связавшихся ранее с малой субъединицей, отделяются от нее, освобождая место для присоединения к ней большой субъединицы рибосомы. Поскольку молекула инициаторной тРНК связывается с Р-участком рибосомы, синтез полипептидной цепи может начаться прямо с присоединения второй молекулы аминоацил-тРНК к А-участку (рис. 5-22). Тем самым завершается сборка функциональной рибосомы с проходящей сквозь нее нитью мРНК (рис. 5-23). Далее следуют очередные этапы фазы элонгации белкового синтеза, описанные выше (см. второй этап на рис. 5-20). Поскольку инициаторная тРНК всегда несет аминокислоту метионин или (у прокариот) его аминоформилированное производное, у всех новосинтезированных белковых цепей на N-конце обнаруживается остаток метионина. Этот метионин часто вскоре после включения удаляется специфичной аминопептидазой, что весьма существенно, потому что аминокислота, стоящая на аминном конце, может определять время жизни клеточных белков, воздействуя на убиквитин - зависимый путь деградации (см. разд. 8.2.5).

Выбор правильной точки инициации синтеза на молекуле мРНК определяется, очевидно, малой субъединицей, действующей совместно с факторами инициации (но в отсутствие большой субъединицы); вследствие этого, вероятно, все рибосомы и состоят из двух субъединиц. Теперь мы познакомимся с тем, как осуществляется этот выбор.

5-45

5.1.11. У эукариот на каждой молекуле мРНК синтезируется только один вид полипептидных цепей [10]

В молекуле мРНК имеется обычно много триплетов AUG, и каждый из них кодирует метионин. Однако у эукариот лишь один из этих триплетов AUG узнается инициаторной тРНК, т. е. выступает в качестве **старт-кодона.** Как рибосома узнает этот старт-кодон?

Механизм для выбора старт-кодона у эукариот и прокариот различен. Молекулы эукариотических мРНК (за вычетом тех, которые синтезируются в митохондриях и хлоропластах) сразу же по завершении транскрипции подвергаются в клеточном ядре весьма существенным модификациям (см. разд. 9.4.8). Два главных изменения такого рода состоят в добавлении к 5'-концу особой структуры, так называемого **кэпа,** состоящего из остатка 7-метилгуанозина, связанного с трифосфатом (рис. 5-24), а к 3'-концу - фрагмента, состоящего приблизительно из 200 остатков адениловой кислоты (polyA). Играет ли polyA какую-нибудь роль в процессе трансляции, мы пока не знаем. Что же касается кэпа на 5'-конце, то он для эффективного белкового синтеза необходим. Опыты с экстрактами эукариотических клеток показали, что малая рибосомная субъединица присоединяется к 5'-концу цепи мРНК, чему способствует узнавание ею 5'-кэпа (рис. 5.22). Затем эта малая субъединица, несущая связанную с нею инициаторную тРНК, перемещается вдоль цепи мРНК в поисках старт-кодона AUG. Требования к старт-кодону не являются, по-видимому, слишком жесткими: необходимо всего несколько дополнительных нуклеотидов помимо самого триплета AUG. У большинства видов РНК используется первый подходящий кодон AUG поблизости от 5'-конца, при этом ни один из многих других триплетов AUG в цепи мРНК служить точкой инициации полипептид-

Рис. 5-24. 5'-Кэп, имеющийся в молекулах мРНК у эукариот. Отметим необычную 5' → 5'-связь с положительно заряженным остатком 7-метилгуанозина и метилирование 2'-гидроксила первого остатка рибозы в РНК. (Второй остаток рибозы метилирован не всегда.)

ной цепи уже не может. Поэтому на данной молекуле мРНК синтезируется, как правило, лишь один какой-нибудь вид полипептидной цепи. По всем этим признакам прокариотические мРНК совершенно отличны от эукариотических (рис. 5-25). У бактериальных матриц 5'-кэп отсутствует. Вместо этого они содержат специфические инициаторные последовательности примерно из шести нуклеотидов, встречающиеся на протяжении одной и той же цепи мРНК неоднократно в разных ее участках. Такие последовательности располагаются обычно перед очередным триплетом AUG, отделенные от него несколькими (от 4 до 7) нуклеотидами; они спариваются со специфическим участком рРНК рибосомы и это служит сигналом для инициации синтеза белка у ближайшего старт-кодона. Более того, хотя бактериальные рибосомы и узнают терминирующие кодоны как сигналы для окончания синтеза одной полипептидной цепи, они могут «проскользнуть» дальше по матрице. Поэтому бактериальные мРНК обычно *полицистронны,* т.е. кодируют многие белки, синтезируемые на одной и той же молекуле

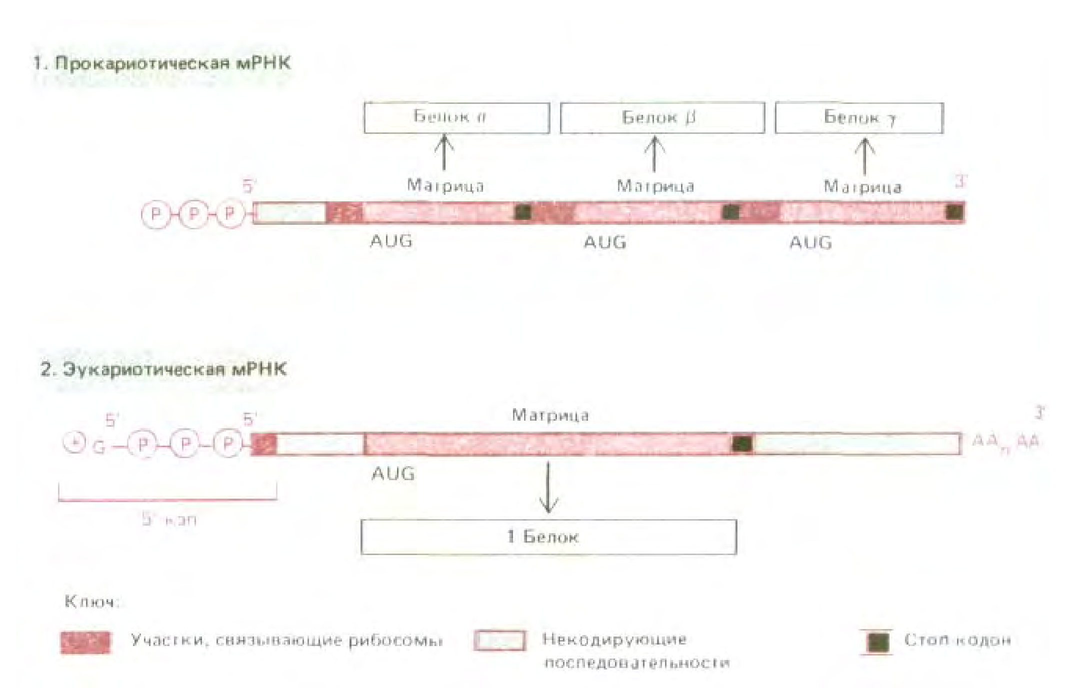


Рис. 5-25. Сравнение структуры прокариотической и эукариотической мРНК. В момент завершения синтеза обе эти мРНК имеют на 5'-конце трифосфат, но эукариотическая мРНК немедленно вслед за тем приобретает 5'-кэп. У эукариот малая рибосомная субъединица узнает 5'-конец мРНК именно благодаря 5'-кэпу. Поэтому синтез белка начинается со старт-кодона, ближайшего к 5'-концу (см. рис. 5-22). В отличие от этого у прокариот 5'-конец не имеет особого значения и рибосомы могут присоединяться ко многим участкам нити мРНК, что всякий раз дает начало синтезу иного белка.

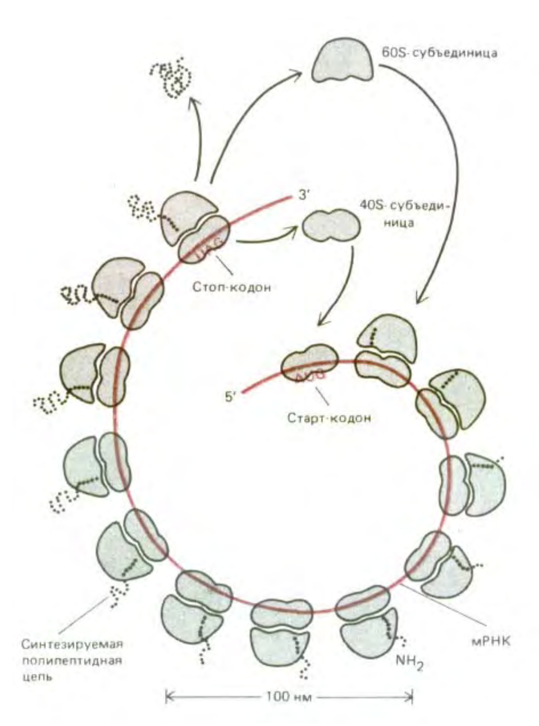


Рис. 5-26. Схематическое изображение полирибосомы, показывающее, как ряд рибосом одновременно осуществляет трансляцию на одной и той же молекуле мРНК. В эукариотических клетках синтез каждой полипептидной цепи начинается с присоединения малой рибосомной субъединицы к единственному подходящему для этого участку на молекуле мРНК и трансляция идет вдоль этой молекулы в направлении 5' → 3'. По завершении данной полипептидной цепи обе субъединицы рибосомы отделяются от молекулы мРНК.

мРНК. В отличие от них эукариотические мРНК, как правило, *моноцистронны,* иными словами, на одной такой молекуле мРНК может идти синтез только одного вида полипептидной цепи (рис. 5.25).

5.1.12. Множество рибосом, присоединившихся к одной молекуле мРНК, образуют полисому [11]

Синтез одного белка длится в среднем от 20 до 560 секунд. Однако даже за этот очень короткий период на каждой молекуле мРНК, где идет процесс трансляции, инициация синтеза обычно осуществляется многократно. Новая рибосома присоединяется к 5'-концу молекулы мРНК сразу же после того, как предыдущая свяжет между собой достаточное количество аминокислот, чтобы освободить ей место. Молекулы мРНК в этом случае входят в состав **полирибосом** (или полисом) - структур, в которых на одну молекулу мРНК нанизано много рибосом, отстоящих друг от друга на расстояние приблизительно в 80 нуклеотидов (рис. 5-26 и 5-27). У прокариот (в отличие от эукариот) рибосомы могут присоединяться к мРНК, как только она образовалась. Они начинают синтез белка на 5'-конце новой молекулы мРНК и движутся вслед за РНК-полимеразой, достраивающей цепь мРНК.

Полирибосомы весьма характерны для клеток. От находящихся в цитозоле свободных рибосом их отделяют ультрацентрифугированием

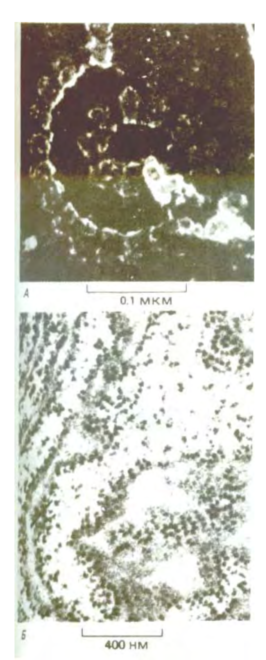


Рис. 5-27. Электронные микрофотографии типичных полирибосом, осуществляющих синтез белка в эукариотической клетке. *А.* Глубокое травление. (С любезного разрешения John Heuser.) *Б.* Тонкий срез. Цитоплазма клетки обычно заполнена такими полирибосомами лежащими в цитозоле свободно или прикрепленными к мембранам. (С любезного разрешения George Palade.)

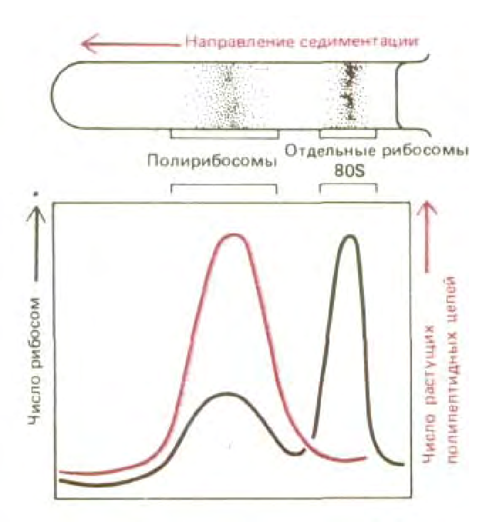


Рис. 5-28. Отделение полирибосом от свободных рибосом (и от их субъединиц) с помощью центрифугирования. Метод основан на том, что крупные молекулярные агрегаты движутся в сильном гравитационном поле быстрее, нежели мелкие. Обычно седиментацию проводят в градиенте сахарозы, чтобы стабилизировать раствор - предотвратить его перемешивание за счет конвекции.

после лизиса клеток (рис. 5-28). Выделенную из полирибосомы мРНК можно использовать, чтобы убедиться в том, что белок, кодируемый данной последовательностью ДНК, активно синтезируется клетками, из которых были получены полирибосомы. Она может послужить также исходным материалом для создания специальных библиотек кДНК (см. разд. 5.6.3).

10-25

5.1.13. Общая скорость белкового синтеза регулируется у эукариот факторами инициации [12]

Известно (подробнее об этом см. гл. 13), что клетки многоклеточного организма размножаются только тогда, когда они находятся в соответствующем окружении и на них воздействуют специфические факторы роста. Механизм действия этих факторов роста не совсем ясен, но несомненно, что одним из главных эффектов должно быть увеличение общей скорости белкового синтеза (см. разд. 13.3.4). Чем определяется эта скорость? Прямые исследования на тканях крайне сложны, но если клетки в культуре не получают достаточного количества питательных веществ, то резко снижается скорость инициации синтеза полипептидных цепей, причем можно показать, что это торможение обусловливается инактивацией одного из факторов инициации белкового синтеза, а именно IF-2. Показано, что по крайней мере у одного типа клеток (в незрелых эритроцитах) активность IF-2 снижается контролируемым образом в результате фосфорилирования одной из трех его белковых субъединиц. Можно предположить поэтому, что скорость белкового синтеза у эукариот регулируется в известной степени специфическими протеинкиназами, которые в своей активной форме тормозят его инициацию. Возможно, что действие факторов роста осуществляется при посредстве каких-то регуляторных веществ, которые инактивируют эти протеинкиназы или нейтрализуют их эффект.

У эукариот факторы инициации, необходимые для синтеза белка, более многочисленны и более сложны, нежели у прокариот, хотя и у тех, и у других они выполняют одни и те же основные функции. Многочисленные дополнительные компоненты, возможно, представляют собой регуляторные белки, реагирующие на разные факторы роста и координирующие рост и размножение клеток в многоклеточных организмах. У бактерий нет потребности в такой регуляции: они растут с той скоростью, какую допускает наличие в среде питательных веществ.

5-9

5.1.14. Точность белкового синтеза обеспечивается двумя различными механизмами [13]

Судить о частоте ошибок в процессе белкового синтеза можно, определив, как часто включается в данный белок какая-нибудь аминокислота, в норме в нем отсутствующая. Наблюдения показывают, что в среднем на каждые 10^4 аминокислот включается одна «неправильная» аминокислота, и, значит, только одна ошибка приходится на каждые 25 синтезируемых белков среднего размера (400 аминокислот). Точность процесса декодирования зависит от надежности двух адапторных механизмов, о которых мы уже говорили выше: от связывания каждой аминокислоты с соответствующей молекулой тРНК и от спаривания кодонов в мРНК с антикодонами тРНК (см. рис. 5-12). Неудивительно, что в ходе эволюции в клетках возникли механизмы, которые обеспечивают снижение числа ошибок на этих двух ключевых этапах белкового синтеза.

Два механизма, действующие на этих двух этапах, совершено

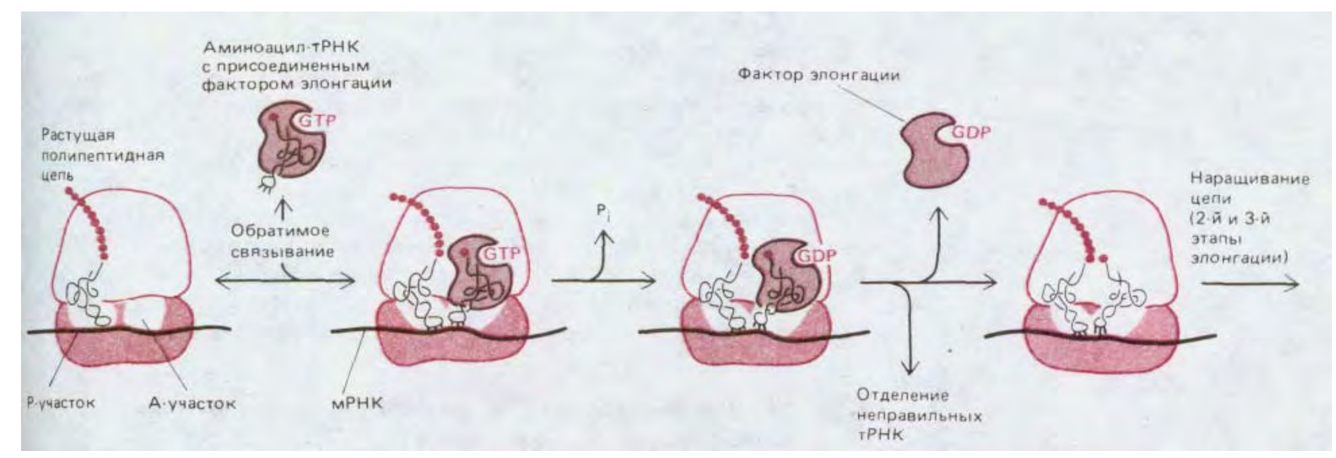


Рис. 5-29. Более подробное изображение первого этапа фазы элонгации белкового синтеза, позволяющее видеть, как отбирается на рибосоме правильная тРНК. На начальной стадии связывания молекула аминоацил-тРНК с присоединенным фактором элонгации временно спаривается с кодоном в А-участке. Спаривание служит сигналом для гидролиза GTP, вызываемого фактором элонгации, благодаря этому фактор элонгации получает возможность отделиться от молекулы аминоацил-тРНК, которая теперь стоит точно на своем месте в А-участке и может сыграть предназначенную ей роль в элонгации полипептидной цепи (см. рис. 5-20). Только тРНК с правильным антикодоном остаются спаренными с мРНК достаточно долго для того, чтобы участвовать в элонгации цепи. Фактор элонгации (имеющий белковую природу) у прокариот обозначается EF-Tu (ФЭ-Tu), а у эукариот-EF-1 (ФЭ-1).

различны; каждый из них отражает стратегию, используемую клеткой в других процессах. Оба механизма сопряжены, однако, с затратой свободной энергии, поскольку, как уже отмечалось в гл. 2 (см. разд. 2.2), за всякое возрастание упорядоченности приходится платить. Надежность связывания аминокислоты с тРНК обеспечивается сравнительно простым механизмом. У многих аминоацил-тРНК-синтетаз имеется два отдельных активных центра: один, ответственный за реакцию, в результате которой тРНК нагружается аминокислотой (рис. 5-10), и другой, распознающий неправильную аминокислоту, присоединившуюся к тРНК, и удаляющий ее путем гидролиза. Подобный процесс коррекции обходится дорого, поскольку работать эффективно он может лишь в том случае, если будет удалять заодно и довольно значительное число правильно присоединившихся аминокислот. Аналогичный дорогостоящий двухэтапный процесс коррекции используется и в репликации ДНК (см. разд. 5.3.3).

Точность спаривания кодона с антикодоном обеспечивается более тонким механизмом «кинетической коррекции». Ранее мы ограничивались лишь упрощенным описанием этого спаривания. В действительности, после того как молекулы тРНК присоединят соответствующую аминокислоту, они образуют комплекс с особым белком, так называемым *фактором элонгации* (ФЭ, EF), который прочно связывается с аминоацильным концом молекулы тРНК и с молекулой GTP. Именно этот комплекс, а не свободная молекула тРНК спаривается с надлежащим кодоном в молекуле мРНК. Связанный таким образом фактор элонгации обеспечивает возможность правильного спаривания антикодона с кодоном, но при этом препятствует включению данной аминокислоты в растущую полипептидную цепь. Однако начальное узнавание кодона служит для фактора элонгации сигналом к гидролизу связанного с ним GTP (до GDP и неорганического фосфата), после чего сам фактор отделяется от рибосомы без своей тРНК, так что синтез

белка может продолжиться. Из рис. 5-29 видно, что благодаря фактору элонгации возникает короткий разрыв во времени между спариванием антикодона с кодовом и элонгацией полипептидной цепи, что позволяет присоединившейся молекуле тРНК отделиться от рибосомы. Неправильная молекула тРНК образует в паре кодон-антикодон меньше водородных связей, чем правильная; поэтому она слабее удерживается на рибосоме и, значит, за данный промежуток времени имеет больше шансов отделиться. Поскольку из-за вызванной фактором элонгации задержки большая часть неправильно присоединившихся молекул тРНК удаляется с рибосомы и не используется в белковом синтезе, ясно, что этот фактор снижает долю неправильных аминокислот в синтезируемом белке.

5.1.15. Многие ингибиторы белкового синтеза прокариот-эффективные антибиотики [14]

Многие из наиболее эффективных антибиотиков, применяемых в современной медицине, действуют, подавляя в бактериальных клетках синтез белка. Ряд таких лекарственных препаратов создан с учетом структурных и функциональных различий между рибосомами прокариот и эукариот, т. е. с расчетом на то, что они будут действовать преимущественно на прокариотические рибосомы. Именно в силу избирательности их действия эти соединения можно назначать человеку в относительно

Таблица 5-1. Ингибиторы синтеза белка или РНК

Ингибитор	Специфический эффект
Эффективен только для прокариот [1]	
Тетрациклин	Блокирует связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы
Стрептомицин	Препятствует переходу от инициаторного комплекса к рибосоме, осуществляющей удлинение цепи; нарушает декодирование
Хлорамфеникол	Блокирует пептидил-трансферазную реакцию на рибосомах (2-й этап на рис. 5-20)
Эритромицин	Блокирует реакцию транслокации на рибосомах (3-й этап на рис. 5-20)
Рифамицин	Блокирует инициацию цепей РНК, присоединяясь к РНК-полимеразе (препятствует синтезу РНК)
Эффективен и для прокариот, и для эукариот	
Пуромицин Актиномицин D	Присоединяясь к растущему концу синтезируемой полипетидной цепи, вызывает ее преждевременное отделение от рибосомы Связывается с ДНК и блокирует перемещение РНК-полимеразы (препятствует синтезу РНК)
Эффективен только для эукариот	
Циклогексимид	Блокирует реакцию транслокации на рибосомах (3-й этап на рис. 5-20)
Анизомицин	Блокирует пептидил-трансферазную реакцию на рибосомах (2-й этап на рис. 5-20) 1
α-Аманитин	Блокирует синтез мРНК вследствие преимущественного связывания с РНК-полимеразой II

[1)] Рибосомы в митохондриях (и хлоропластах) эукариот по своей чувствительности к ингибиторам часто близки к рибосомам прокариот.

высоких концентрациях, не опасаясь токсических эффектов. Разные антибиотики связываются с различными участками бактериальных рибосом и поэтому часто ингибируют разные этапы процесса синтеза. В табл. 5-1 перечислены наиболее известные соединения этой группы и указано их специфическое действие. В таблицу включены также и некоторые другие часто применяемые ингибиторы белкового синтеза, в том числе и такие, которые действуют на эукариотические клетки; эти последние, разумеется, в качестве антибиотиков применять нельзя.

Многие из соединений, перечисленных в табл. 5-1, блокируют совершенно определенные этапы передачи генетической информации от ДНК к белку, поэтому они находят широкое применение при изучении различных клеточных механизмов. Среди лекарственных препаратов, используемых для этой же цели, следует назвать *хлорамфеникол, циклогексимид* и *пуромицин.* Все они ингибируют белковый синтез специфическим образом. Хлорамфеникол, например, в эукариотических клетках ингибирует белковый синтез только на рибосомах в митохондриях (и в хлоропластах растений), что, возможно, отражает происхождение этих органелл от прокариот (см. разд. 7.5.16). Циклогексимид, наоборот, действует только на рибосомы в цитозоле. Различная чувствительность белкового синтеза к этим двум препаратам позволяет весьма надежно определять, в каком именно клеточном компартменте идет трансляция с образованием того или иного белка. Особенно интересен пуромицин, поскольку он по своей структуре весьма напоминает концевой аминоациладенилат в составе аминоацил-тРНК и потому реагирует на рибосоме с С-концом растущей пептидил-тРНК, как это должно было бы произойти с соответствующей аминокислотой. Дальнейшая элонгация, однако, в результате этого становится невозможной - происходит преждевременный обрыв цепи и пептидилпуромицин покидает рибосому. Естественно поэтому, что пуромицин ингибирует все виды белкового синтеза.

5.1.16. Эволюция белкового синтеза [15]

Молекулярные процессы, лежащие в основе синтеза белка, необъяснимо сложны. Хотя мы теперь в состоянии многие из них описать, смысл их остается для нас непонятным в отличие, например, от процессов транскрипции, репарации и репликации ДНК. Как мы уже знаем, синтез белка у современных организмов происходит на очень крупном рибонуклеопротеиновом комплексе - на рибосоме, состоящей из различных белков, группирующихся вокруг сердцевины из молекул рРНК. Зачем вообще нужны молекулы рРНК и как случилось, что они приобрели главенствующую роль в структуре и функции рибосом? Ответ на этот вопрос, несомненно, поможет нам лучше понять и сам белковый синтез. Ранее, до того как в начале 60-х годов была открыта мРНК, предполагалось, что значительные количества РНК в рибосомах несут информативную функцию - осуществляют передачу генетической информации от ДНК к белкам. Теперь, однако, мы знаем, что во всех рибосомах клетки имеется один и тот же набор молекул рРНК и что эти молекулы такой информативной роли не играют. В отношении бактериальных рибосом удалось выяснить, что отдельные небольшие участки рРНК выполняют каталитические функции в белковом синтезе; установлено, например, что рРНК малой субъединицы прокариотических рибосом при спаривании с инициаторной последовательностью в молекуле мРНК образует короткую спираль, что помогает поместить соседний старт-кодон AUG в Р-участок. Аналогичные взаимодействия на основе спаривания возможны также между молекулами тРНК и рРНК, хотя убедительно продемонстрировать это пока не удалось.

В белковом синтезе важную роль играет также большое число различных белков, связанных с рРНК рибосом. Чрезвычайная сложность процесса, в который вовлечено столько компонентов, заставила многих биологов разувериться в том, что когда-нибудь будут поняты пути его эволюции. Однако недавнее открытие - обнаружение молекул РНК, способных действовать как ферменты (см. разд. 3.2. 11), - позволило по-новому взглянуть на данный предмет. Как уже отмечалось в гл. 1, в первых биологических реакциях катализаторами могли служить не белковые молекулы, а молекулы РНК. Возможно, что на ранних этапах. в первых клетках, молекулы тРНК сами, без участия аминоацилт РНК-синтетаз, формировали каталитические поверхности, которые позволяли им связывать и активировать аминокислоты. Не исключено, что в то время роль целой «рибосомы» выполняли молекулы рРНК, свертывавшиеся таким образом, что возникала сложная система поверхностей, обеспечивающая и направленное спаривание тРНК с кодонами мРНК, и катализ полимеризации связанных с тРНК аминокислот (см. рис. 1-7). В ходе эволюции к этому аппарату могли присоединяться отдельные белки, каждый из которых делал рассматриваемый процесс более надежным и эффективным. Высокая доля РНК в современных рибосомах, вероятно, сохранилась от тех очень ранних этапов эволюции, когда белки еще не занимали главного места в биологическом катализе.

Заключение

Для того чтобы мог начаться синтез какого-нибудь определенного белка, должна сначала образоваться соответствующая мРНК (путем транскрипции ДНК). К этой мРНК, к ее старт-кодону, присоединяется малая рибосомная субъединица; узнает старт-кодон особая инициаторная тРНК. Присоединение большой субъединицы завершает сборку рибосомы, Далее следует фаза элонгации белкового синтеза. Во время этой фазы разные аминоацил-тРНК, нагруженные каждая своей аминокислотой, поочередно связываются с соответствующим кодоном на мРНК путем спаривания его оснований с основаниями антикодона тРНК. Каждая очередная аминокислота присоединяется к карбоксильному концу растущего полипептида в результате циклического процесса, состоящего из трех последовательных этапов: связывания аминоацил-тРНК, образования пептидной связи и транслокации рибосомы. Рибосома перемещается вдоль молекулы мРНК в направлении 5' → 3' от одного кодона к другому до тех пор, пока не будет достигнут какой-либо из трех стоп-кодонов. К этому стоп-кодону присоединяется затем фактор освобождения, вызывающий отделение завершенного полипептида от рибосомы.

Рибосомам прокариот и эукариот свойственна высокая степень гомологии, несмотря на довольно существенные различия в числе и в размерах обоих видов компонентов - рРНК и белков. Преобладающая роль рРНК в структуре и функции рибосом, возможно, отражает происхождение белкового синтеза, на ранних этапах эволюционировавшего в среде, где катализ осуществляется с помощью РНК.

5.2. Механизмы репарации ДНК [16]

В то время как шансы на долговременное существование вида могут возрастать вследствие изменений в его генетической конституции, выживание в каждый конкретный момент требует безусловного сохранения генетической информации. Для поддержания такого постоянства генетического материала требуется не только чрезвычайно точный механизм копирования нуклеотидных последовательностей ДНК в каждом новом клеточном поколении, но и механизм исправления

повреждений, спонтанно возникающих в ДНК. Большая часть таких повреждений носит временный характер, поскольку они действительно устраняются с помощью особого механизма, который носит название **репарации ДНК.** Если этот обеспечивающий клеточное постоянство механизм не срабатывает, изменение закрепляется. Подобное изменение называют **мутацией.** Он может оказаться гибельным для организма, если затронет какую-нибудь жизненно важную последовательность ДНК.

Прежде чем говорить о механизмах репарации ДНК, коснемся вкратце вопроса о том, как воспроизводятся нуклеотидные последовательности ДНК из поколения в поколение.

5.2.1. Высокая надежность сохранения нуклеотидных последовательностей ДНК [17]

Частоту изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК *(частота возникновения мутаций* или скорость мутирования) удается определять только косвенным путем. Один из способов состоит в сравнении аминокислотных последовательностей одного и того же белка у нескольких биологических видов. Долю аминокислот, которые окажутся при этом различными, сопоставляют затем с числом лет, прошедших с того момента, как два данных вида дивергировали в процессе эволюции от общего предка (этот срок оценивают на основе данных палеонтологической летописи). Исходя из этого можно вычислить среднее число лет, необходимое для того, чтобы какое-либо стойкое изменение затронуло одну из аминокислот данного белка. Поскольку каждое такое изменение отражает, как правило, одиночное изменение в нуклеотидной последовательности гена, кодирующего этот белок, мы тем самым узнаем и среднее число лет, требующееся для возникновения в данном гене одной стабильной мутации.

Такого рода определения дают нам всегда сильно заниженные оценки скорости мутирования, так как большая часть мутаций нарушает функцию данного белка и исчезает из популяции под давлением отбора. Есть, однако, среди изученных белков одно семейство, для которого это возражение почти не имеет силы. Это так называемые **фибринопептиды** - фрагменты из 20 аминокислотных остатков, отщепляемые от белка фибриногена, когда он при свертывании крови, активируясь, превращается в фибрин. Фибринопептиды не выполняют никакой прямой функции, а потому они толерантны почти ко всем возможным аминокислотным заменам. Анализ фибринопептидов показывает, что белок среднего размера, состоящий из 400 аминокислот, изменяется случайным образом в результате одной аминокислотной замены приблизительно каждые 200000 лет. Позже с разработкой методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК (см. разд. 4,6.6), появилась возможность выявить степень сходства нуклеотидных последовательностей ДНК в гомологичных некодирующих участках генома у разных видов млекопитающих. Полученные таким путем оценки частоты мутаций прекрасно согласуются с теми, какие дает анализ фибронопептидов.

5.2.2. Скорость мутирования в растущих клетках совпадает с оценками, полученными на основе эволюционных исследований [18]

Скорость мутирования можно оценить прямым способом, подсчитывая количество генетических изменений, спонтанно возникающих в большой популяции клеток за относительно короткий промежуток времени. Для этого определяют частоту возникновения новых мутантов в очень

больших популяциях животных (например, у плодовой мушки или в колониях мышей), либо проводят скрининг с целью выявить изменения в активности определенных ферментов у клеток, растущих в культуре. Хотя такие оценки носят лишь приближенный характер, они в обоих случаях согласуются с представлением о том, что при репликации на 10^9 пар оснований (в среднем) происходит одна ошибка, т. е. одна замена пары оснований. Следовательно, для того чтобы в гене, кодирующем средний по размерам белок и насчитывающем примерно 10^3 кодирующих пар оснований, могла возникнуть мутация, требуется около 10^6 клеточных поколений. Эта величина достаточно удовлетворительно согласуется с оценкой, полученной на основе эволюционных исследований, согласно которой мутация в среднем гене зародышевой линии возникает один раз каждые 200000 лет.

5-16

5.2.3. Большинство мутаций, изменяющих белки, вредны и элиминируются естественным отбором [17]

Если число различий в аминокислотном составе одного и того же белка у двух разных биологических видов представить как функцию времени, прошедшего с момента дивергенции этих видов, то мы получим прямую линию. Иными словами, чем длиннее период, прошедший с момента дивергенции, тем больше число таких различий. Для удобства наклон прямой может быть охарактеризован через единицу эволюционного времени для данного белка (среднее время, необходимое для того, чтобы в последовательности из 100 аминокислот появилась одна аминокислотная замена). Сделав это для разных белков, мы убедимся в том, что каждый из них характеризуется своей особой скоростью эволюции (рис. 5-30). Поскольку все пары оснований в ДНК подвержены случайным изменениям в равной мере, эти разные скорости отражают различия в вероятности для тех или иных организмов со случайной

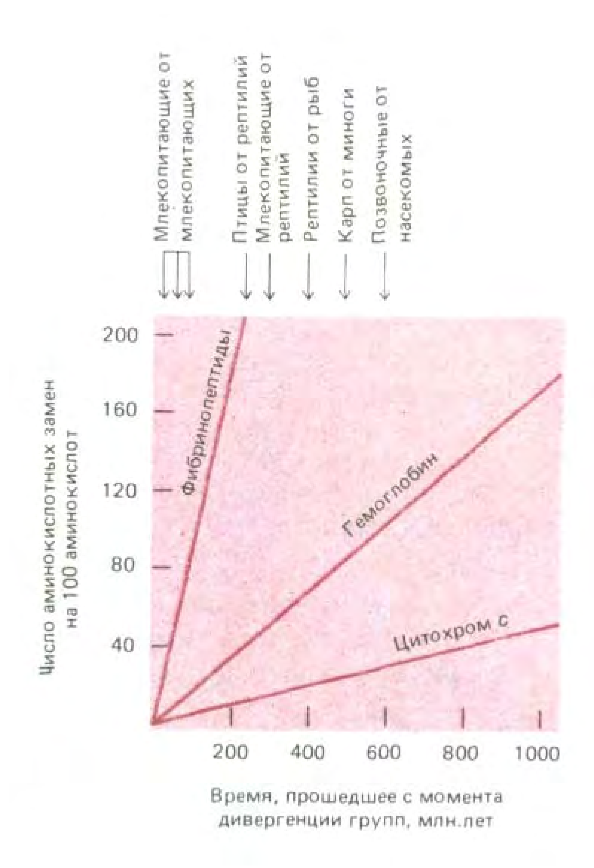


Рис. 5-30. Сравнение частот аминокислотных замен в гемоглобине и цитохроме *c* с соответствующей величиной для фибринопептидов. Гемоглобин и цитохром *c* изменяются в процессе эволюции гораздо медленнее, чем фибринопептиды. Определяя частоты замен (табл. 5-2) в расчете на год, важно помнить, что два организма, дивергировавшие от общего предка 100 млн. лет назад, отделены друг от друга 200 млн. лет эволюционного времени.

мутацией в данном белке выжить и сохранить способность к размножению. Ясно, что изменения в аминокислотной последовательности нарушают функцию у одних белков гораздо сильнее, чем у других. Данные, приведенные в табл. 5-2, позволяют считать, что в гемоглобине вредными оказываются примерно 6 из каждых 7 случайных аминокислотных замен, в цитохроме с - 29 из каждых 30, тогда как в гистоне Н4 почти все аминокислотные замены вредны. Можно думать, что носители таких вредных мутаций элиминируются из популяции под действием естественного отбора.

5.2.4. Наблюдаемые низкие частоты мутаций необходимы для сохранения вида в целом и каждого индивидуума [19]

Поскольку мутации по большей части вредны, ни один биологический вид не может позволить себе быстро накапливать их в своих половых клетках. Позже мы обсудим (см. разд. 9.1.3), почему при наблюдаемой частоте мутаций, хотя она и невысока, число необходимых белков, которые могут быть закодированы в клетках зародышевого пути любого организма, не должно превышать 60000. Если бы частота мутаций была в 10 раз выше, в силу той же причины организм должен был бы довольствоваться 6000 белков. В этом случае эволюция, очевидно, не пошла бы дальше организмов, стоящих по степени сложности примерно на уровне плодовой мушки.

Итак, сохранение вида требует, чтобы половые клетки организмов были защищены от быстрых генетических изменений, но сохранение каждого конкретного индивидуума требует такой же защиты и для всех прочих клеток многоклеточного организма (соматических клеток). Нуклеотидные замены в соматических клетках могут способствовать естественному отбору в пользу тех или иных лучше приспособленных клеток и привести к их неконтролируемому размножению, т. е. развитию рака, на долю которого в Западном полушарии приходится около 20% всех преждевременных смертей. Убедительные данные подтверждают, что гибель людей в данном случае вызвана главным образом накоплением изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК соматических клеток. Десятикратное повышение частоты мутаций привело бы, вероятно, к катастрофическому росту раковых заболеваний вследствие того, что чаще возникали бы различные вариантные формы соматических клеток. Таким образом и сохранение того или иного вида с его 60000 белков (стабильность половых клеток), и предотвращение рака, возникающего как следствие мутаций в соматических клетках (стабильность соматических клеток), зависят у эукариот от чрезвычайно высокой надежности сохранения нуклеотидных последовательностей ДНК.

5.2.5. Низкие частоты мутаций означают, что родственные организмы построены практически из одних и тех же белков [17]

Человек как род, отличный от крупных человекообразных обезьян, возник всего несколько миллионов лет назад. В каждом гене, следовательно, могло произойти за это время лишь сравнительно немного нуклеотидных замен, причем большинство из них естественный отбор должен был элиминировать. Сравнение человека и обезьян показывает, например, что их цитохромы *с* различаются лишь по 1% аминокислотных остатков, а их гемоглобины - приблизительно по 4%. Значительная часть нашего генетического наследия сформировалась, несомненно, задолго до появления *Homo sapiens,* в процессе эволюции млекопитающих (начавшейся приблизительно $3 \cdot 10^8$ лет назад) и даже ранее.

Таблица 5-2. Наблюдаемые скорости изменения аминокислотных последовательностей в различных белках на протяжении эволюционного времени

Белок	Единица эволюционного времени [1)], млн. лет
Фибринопептид	0,7
Гемоглобин	5
Цитохром *с*	21
Гистон Н4	500

[1)] Единица эволюционного времени - среднее время, необходимое для того, чтобы в данном белке на каждые 100 содержащихся в нем аминокислот могла появиться одна приемлемая аминокислотная замена.

Неудивительно поэтому, что у таких филогенетически далеких млекопитающих, как кит и человек, белки очень сходны. Эволюционный процесс, породивший резкие морфологические различия между млекопитающими, «добился» этих различий при поразительно малых изменениях в том материале, из которого мы все построены. Предполагается, что эти морфологические различия в значительной мере определяются неодинаковым временным и пространственным характером экспрессии генов во время эмбрионального развития. В гл. 10 мы обсудим, как подобные изменения в экспрессии генов могли возникнуть (см. разд. 10.5.8).

5-13
5-17

5.2.6. Без коррекции спонтанные повреждения в ДНК быстро] изменили бы ее нуклеотидные последовательности [20]

Физик Эрвин Шрёдингер в 1945 г. высказал мнение, что ген независимо от его химической природы (а она в то время еще не была известна) должен быть крайне мал - не более нескольких атомов. В противном случае, полагал Шрёдингер, огромное число генов, необходимое, как считалось, каждому организму, не могло бы уместиться в клеточном ядре. Было ясно, однако, что при столь малых размерах ген должен быть подвержен значительным изменениям вследствие спонтанных реакций, обусловленных беспорядочными тепловыми соударениями с окружающими молекулами. Возникала, таким образом, серьезная дилемма, поскольку генетические данные свидетельствуют о том, что вещество генов весьма стабильно и спонтанные изменения (мутации) происходят в нем чрезвычайно редко.

Эта шрёдингеровская дилемма вполне реальна. ДНК действительно претерпевает значительные изменения, связанные с тепловыми флуктуациями. Мы знаем, например, что ДНК каждой клетки человеческого организма теряет за сутки около 5000 пуриновых оснований (остатков аденина и гуанина) вследствие термального разрыва М-гликозидных связей между пурином и дезоксирибозой (процесс *апуринизации)*. Аналогичный пример составляют спонтанно происходящие в ДНК реакции

Рис. 5-31. Дезаминирование и апуринизация две часто встречающиеся спонтанные химические реакции, вызывающие в клетках серьезное повреждение ДНК. Здесь приведено лишь по одному примеру реакций этих двух типов.

дезаминирования цитозина в урацил, частота которых, согласно оценкам, достигает 100 на один геном в сутки (рис. 5-31). Содержащиеся в ДНК основания изменяются также под влиянием реакционноспособных метаболитов, нарушающих их нормальное спаривание, а также под действием ультрафиолетовой радиации Солнца, которая может вызвать образование ковалентной связи между двумя соседними остатками пиримидиновых оснований в ДНК (образование димеров тимина; рис. 5-32). Все перечисленное выше - это лишь небольшая часть тех многочисленных изменений, которые происходят спонтанно в нашей ДНК. Большинство из них должно было бы привести либо к выпадению одной или нескольких пар оснований в дочерней цепи ДНК после цикла репликации, либо к замене пары оснований (например, каждое дезаминирование C → U должно было бы вызвать в конце концов замену пары **C-G** на пару T-A, поскольку U ведет себя сходно с T и образует комплементарную пару с A). Как мы уже знаем, такие изменения, если бы они происходили достаточно часто, имели бы роковые последствия для живых организмов.

5-14

5.2.7. Стабильность генов обеспечивается репарацией ДНК [21]

Хотя в ДНК любой клетки человека под влиянием тепловой энергии происходят ежедневно тысячи случайных изменений, за год в каждой клетке накапливается (если только вообще накапливается) лишь очень небольшое число стабильных изменений нуклеотидной последовательности ДНК. Мы знаем теперь, что среди множества случайных замен оснований в ДНК лишь одна на тысячу приводит к возникновению мутации, все же остальные повреждения очень эффективно ликвидируются в процессе **репарации ДНК.** Все репарационные механизмы основаны на том, что в клетке имеются две копии генетической информации - по одной в каждой из двух цепей молекулы ДНК. Если нуклеотидная последовательность одной из цепей случайно оказывается измененной, информация не утрачивается, поскольку вторая ее копия хранится в нуклеотидной последовательности другой цепи ДНК. Из схемы на рис. 5-33 видно, что основной путь репарации ДНК включает три этапа.

1. Измененный участок поврежденной цепи ДНК распознается и удаляется при помощи специфических ферментов, носящих название *ДНК-репарирующих нуклеаз;* они осуществляют гидролиз фосфодиэфирных связей между поврежденными нуклеотидами и остальной частью молекулы ДНК, в результате чего в спирали ДНК в этом месте возникает брешь.

2. Другой фермент, **ДНК-полимераза,** связывается с 3'-концом поврежденной цепи ДНК и заполняет эту брешь путем присоединения одного нуклеотида за другим, копируя информацию, содержащуюся в «хорошей» (матричной) цепи.

3. В заключение фермент, называемый **ДНК-лигазой,** «сшивает» ДНК и тем самым завершает восстановление интактной молекулы.

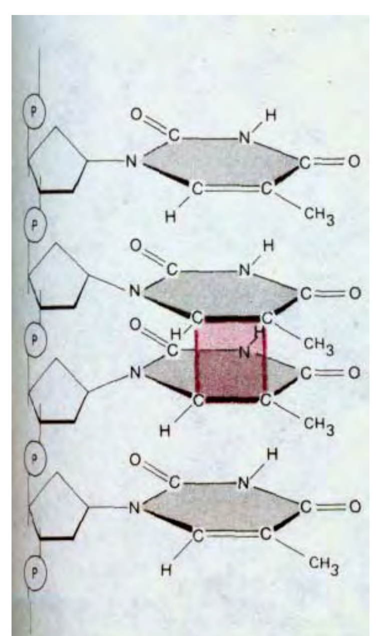


Рис. 5-32. Образование тиминового димера распространенный тип повреждения ДНК под действием ультрафиолетовых лучей (в частности, пол действием солнечного света). Подобный димер способны образовать два любых соседних пиримидиновых основания (C или T).



Рис. 5-33. Три этапа репарации ДНК. На первом этапе вырезается поврежденный участок, на втором и третьем этапах происходит восстановление исходной нуклеотидной последовательности ДНК. ДНК-полимераза заполняет брешь, возникшую вследствие удаления поврежденной части цепи (2-й этап), а ДНК-лигаза сшивает разрыв, оставшийся в «исправленной» цепи (3-й этап). Сшивание осуществляется путем восстановления разорванной фосфодиэфирной связи (см. рис. 5-35).

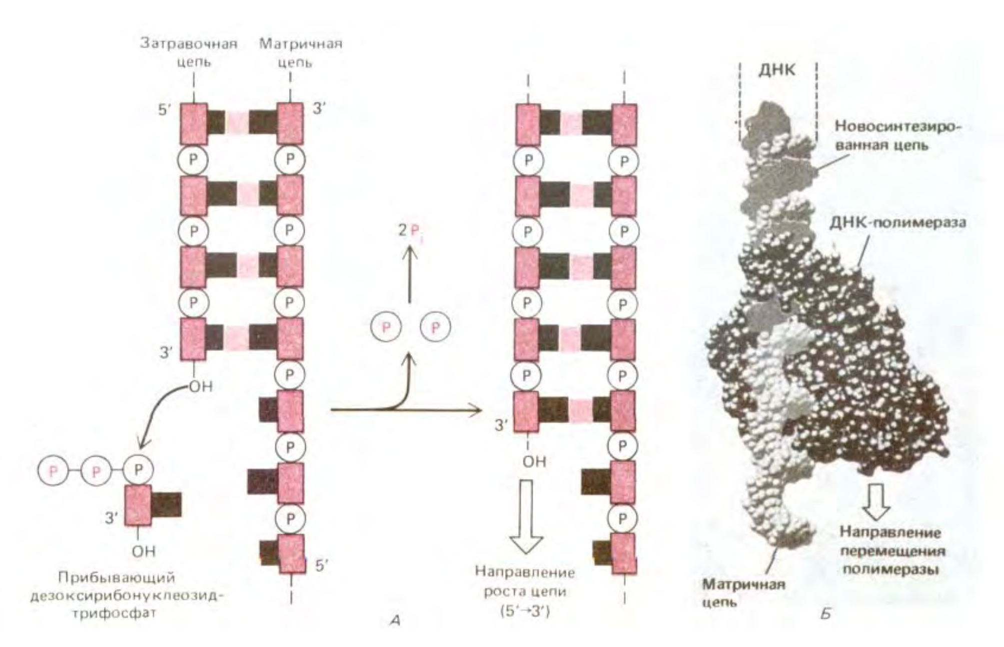
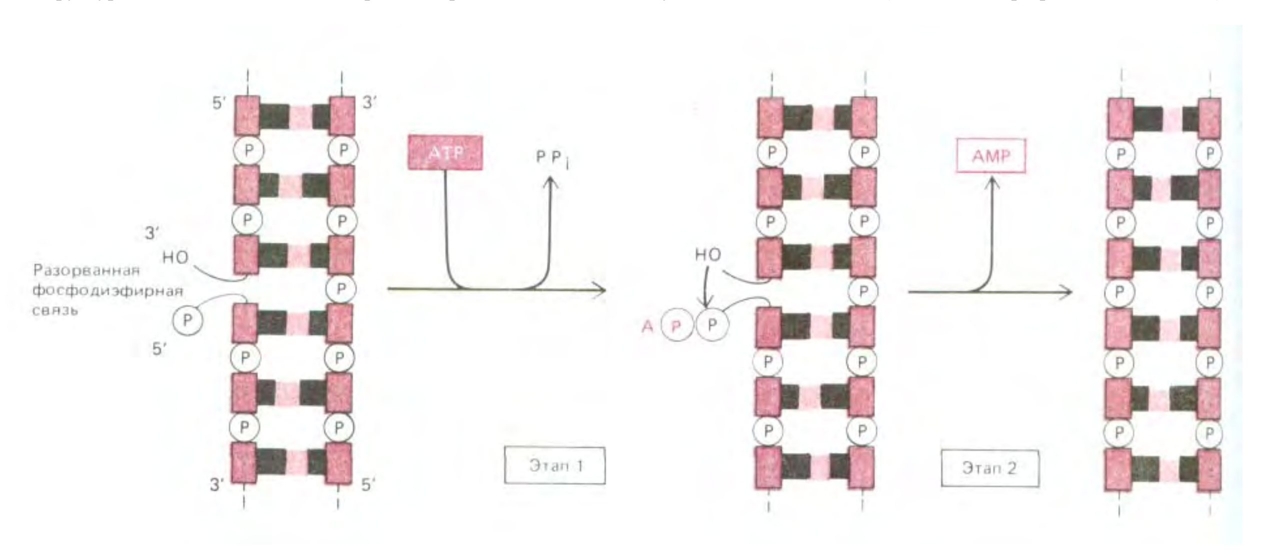


Рис. 5-34. Фермент ДНК-полимераза. *А.* Реакция, катализируемая ДНК-полимеразой. Этот фермент катализирует поэтапное присоединение дезоксирибонуклеотидов к 3'-концу полинуклеотидной (затравочной) цепи, спаренной с другой (матричной) полинуклеотидной цепью. Таким образом, новая цепь ДНК растет в направлении 5' → 3'. Поскольку каждый прибывающий дезоксирибонуклеозидтрифосфат должен спариться с матричной цепью, для того чтобы его могла узнать ДНК-полимераза, именно матричная цепь определяет, какой из четырех возможных дезоксирибонуклеотидов (A, C, G или T) присоединится к 3'-концу синтезируемой цепи. Как и в случае РНК-полимеразы, движущей силой реакции служит значительное выгодное изменение свободной энергии (см. рис. 5-2). *Б.* Структура ДНК-полимеразы *E. coli,* определенная методом рентгеноструктурного анализа. ДНК-полимераза изображена здесь в момент участия в синтезе ДНК. (С любезного разрешения Tom Steitz.)



← **Рис. 5-35.** Фермент ДНК-лигаза восстанавливает разорванную фосфодиэфирную связь. Из схемы видно, что ДНК-лигаза использует сначала молекулу АТР, для того чтобы активировать в точке разрыва 5'-конец поврежденной цепи (1-й этап), и лишь после этого образует новую связь (2-й этап). Энергетически невыгодная реакция сшивания разрыва осуществляется, таким образом, благодаря сопряжению с энергетически выгодным процессом гидролиза АТР. У больных синдромом Блума (одно из наследственных заболеваний) обнаружена частичная недостаточность ДНК-лигазы. В связи с этим у них нарушена репарация повреждений ДНК и как следствие повышена частота заболевания раком.

Ферменты ДНК-полимераза и ДНК-лигаза играют важную роль в метаболизме ДНК: оба этих фермента участвуют не только в репарации, но и в репликации ДНК. Катализируемые ими реакции иллюстрируют соответственно рис. 5-34 и 5-35.

5-18

5-19

5.2.8. Различные типы повреждений в ДНК распознаются разными ферментами [22]

Способ, каким в процессе репарации осуществляется удаление поврежденного участка, зависит от типа повреждения. Например, при апуринизации (наиболее часто встречающемся повреждении ДНК) один из остатков дезоксирибозы лишается ранее находившегося при нем основания (см. рис. 5-31). Фермент АП-эндонуклеаза быстро распознает данный остаток дезоксирибозы и разрывает в этом измененном участке цепи фосфодиэфирную связь. После этого поврежденный нуклеотид удаляется и правильная последовательность нуклеотидов восстанавливается при помощи механизма, представленного на рис. 5-33.

Другой, близкий к этому, путь репарации связан с участием особого набора ферментов, называемых ДНК-гликозилазами. Каждый из этих ферментов узнает какой-либо один определенный тип измененных оснований в ДНК и катализирует гидролитическое отщепление такого основания. Существует, как полагают, не менее шести типов ферментов, входящих в эту группу. Среди них имеются ферменты, удаляющие дезаминированный цитозин, дезаминированный аденин, алкилированные основания разных типов, основания с разомкнутым кольцом и основания, в которых двойная углерод-углеродная связь заменена простой. Общий для всех случаев механизм проиллюстрирован на рис. 5-36 конкретным примером. Здесь представлено удаление дезаминированного цитозина. Сначала фермент урацил-ДНК-гликозилаза удаляет измененное основание (урацил). Дезоксирибозу, утратившую бывшее при ней основание, узнает другой фермент-АП-эндонуклеаза. Поскольку это тот самый фермент, который узнает апуринизированные участки ДНК, восстановление правильной последовательности идет далее тем же путем, который мы уже описали для случая апуринизации. В итоге U, возникший вследствие случайного дезаминирования, вновь замещается на С. Важность процесса удаления из ДНК случайно дезаминированных оснований удалось продемонстрировать непосредственно на конкретных примерах. Один из них касается бактериальных штаммов, у которых вследствие мутации отсутствует фермент урацил-ДНК-гликозилаза. Выяснилось, что у таких мутантов частота спонтанных замен C-G на Т-А (в норме низкая) возрастает приблизительно в 20 раз.

В клетках имеется особый путь для удаления почти любого типа повреждения в ДНК, затрагивающего очень большой ее участок. Такие обширные повреждения возникают, например, при ковалентных взаимо-

действиях между основаниями ДНК и объемистыми углеводородами, в частности бензпиреном, обладающим канцерогенными свойствами. К ним же относятся и различные пиримидиновые димеры (Т-Т, Т-С и С-С), возникающие под действием солнечных лучей (см. рис. 5-32). В подобных случаях крупный мультиферментный комплекс узнает не какое-либо одно специфическое изменение основания, а обширное повреждение двойной спирали ДНК. Фосфодиэфирные связи поврежденной цепи по обе стороны от повреждения разрываются и измененный участок удаляется весь целиком. После этого восстановление нормальной последовательности происходит как обычно.

О роли репарационных процессов свидетельствует тот факт, что клетки затрачивают большую часть своих ресурсов на производство репарационных ферментов. Обширные исследования, проведенные на дрожжах, выявили у них свыше 50 различных генов, кодирующих такие ферменты. Не менее сложны пути репарации ДНК у человека. Выяснилось, что у больных с пигментной ксеродермой нарушен процесс репарации обширных повреждений, в котором, как показывает генетический анализ, участвует не менее 7 различных генных продуктов. У таких больных в клетках накапливаются пиримидиновые димеры, что приводит к тяжелому поражению кожи, включая рак.

5-15

5.2.9. Клетки синтезируют репарирующие ферменты в ответ на повреждение ДНК [23]

В процессе эволюции клетки выработали много различных механизмов, обеспечивающих их выживание в этом мире, полном всевозможных опасностей. Часто какое-нибудь резкое воздействие среды активирует целый набор именно тех генов, продукты которых способны защитить клетки от этого воздействия. Всем клеткам присущ, например, такой механизм, как реакция на тепловой шок; ее можно наблюдать в клетках, подвергшихся действию чрезмерно высоких температур. При этом индуцируется синтез особых «шоковых» белков; часть из них, по-видимому, помогает стабилизировать и репарировать другие клеточные белки, частично денатурированные тепловым шоком.

Во многих клетках существуют также механизмы, дающие им возможность синтезировать ферменты для репарации ДНК, так сказать, в аварийных ситуациях, в ответ на серьезные повреждения ДНК. Среди примеров такого рода лучше всего изучен **SOS-ответ** (SOS-репарация) у *E. со/г*. У этой бактерии любое нарушение репликации ДНК, вызванное ее повреждением, ведет к появлению сигнала (таким сигналом служит, по-видимому, избыток одноцепочечной ДНК), усиливающего транскрипцию более чем 15 различных генов, многие из которых кодируют белки, участвующие в репарации ДНК. Сигнал активирует у *E. coli* белок (см. разд. 5.4.4), который затем разрушает другой белок - отрицательный регулятор активности генов (репрессор). Действие этого репрессора заключается в подавлении у *E. coli* транскрипции всего набора генов, участвующих в SOS-ответе. Изучение бактериальных мутантов с различными нарушениями SOS-репарации показало, что новосинтезированные белки обусловливают два эффекта. Во-первых, их индукция повышает выживаемость клеток: если мутанты, у которых синтез таких ферментов нарушен, подвергнуть действию тех или иных агентов, вызывающих повреждение ДНК (например, ультрафиолетовых лучей), то процент погибших клеток окажется необычно высоким. Во-вторых, некоторые из индуцированных белков вызывают временное повышение частоты мутаций, вследствие чего генетическая изменчивость бактериальной популяции возрастает. Выгода здесь, видимо, заключается в том, что

таким путем увеличивается шансы на появление мутантной клетки с повышенной приспособленностью.

Существуют и другие индуцируемые системы репарации ДНК. Известно, например, что одна из них у бактерий активируется присутствием в ДНК метилированных нуклеотидов. Аналогичная система функционирует в клетках дрожжей. Есть сведения, что и некоторые высшие эукариотические клетки адаптируются к повреждениям ДНК аналогичным путем.

5.2.10. Особенности структуры и химические свойства двойной спирали ДНК облегчают ее репарацию

Молекула ДНК имеет структуру, по-видимому, наилучшим образом приспособленную для репарации. Если гипотеза о том, что РНК появилась в процессе эволюции раньше, чем ДНК верна (см. разд. 1.1.7), возникает вопрос, почему присутствующий в РНК урацил (U) был в ДНК заменен на тимин (Т). Очевидно, это можно объяснить тем, что механизм, осуществляющий удаление дезаминированных остатков цитозина (рис. 5-36), не смог бы функционировать, если бы четвертым нуклеотидом в ДНК был урацил, а не тимин (т. е. не 5-метилурацил). Спонтанное дезаминирование С дает U, и потому фермент, узнающий и удаляющий такие случайно возникшие остатки U, наряду с ними удалял бы и остатки U, которые были бы нормальными компонентами этой ДНК.

Аналогичным образом обстоит дело и в другом случае, а именно в выборе гуанина вместо гипоксантина. Простейший пурин, специфически спаривающийся с С, - это гипоксантин. Но гипоксантин является непосредственным продуктом дезаминирования А (рис. 5-37). Добавив к гипоксантину вторую аминогруппу, эволюция создала гуанин, который не может образоваться из А в результате его спонтанного дезаминирования. Таким образом, любое возможное дезаминирование в ДНК ведет к появлению необычного основания, которое именно в силу своей необычности может быть сразу же распознано и удалено специальной ДНК-гликозилазой (рис. 5-37).

Итак, сама химическая природа оснований гарантирует, что дезаминирование не останется незамеченным. Однако точная репарация (а вместе с тем и радикальное решение шрёдингеровской дилеммы) возможна благодаря существованию двух копий генетической информации, каждая из которых представлена одной из двух цепей двойной спирали ДНК. Лишь в случае крайне маловероятного события, а именно одновременного повреждения обоих членов одной и той же пары оснований, в клетке не окажется ни одной правильной копии, которая могла бы служить матрицей для репарации ДНК.

Генетическая информация может также храниться в одноцепочечной ДНК или РНК, и некоторые очень мелкие вирусы обладают одно-цепочечными геномами, содержащими лишь несколько тысяч нуклеотидов. Описанные выше механизмы не в состоянии осуществлять репарацию таких нуклеиновых кислот, и потому частота мутаций у этих вирусов весьма велика. Лишь организмы с совсем крошечными геномами могут позволить себе хранить генетическую информацию не в двойной спирали ДНК, а в иных структурах.



Рис. 5-36. Путь репарации ДНК с участием урацил-ДНК-гликозилазы, восстанавливающий в цепи ДНК цитозин после его случайного дезаминирования. После действия ДНК-гликозилазы сахарофосфат, утративший бывшее при нем основание, удаляется из цепи АП-эндонуклеазой, тем же ферментом, который участвует и в репарации апуринизированных участков. Далее следуют этапы, показанные на рис. 5-33. В названии «АП-эндонуклеаза» отражен тот факт, что данный фермент распознает в спирали ДНК любой участок, содержащий остаток дезоксирибозы, утративший бывшее при нем основание. Утраченное основание может быть либо пурином (апуринизированные участки), либо пиримидином (апиримидинизированные участки).

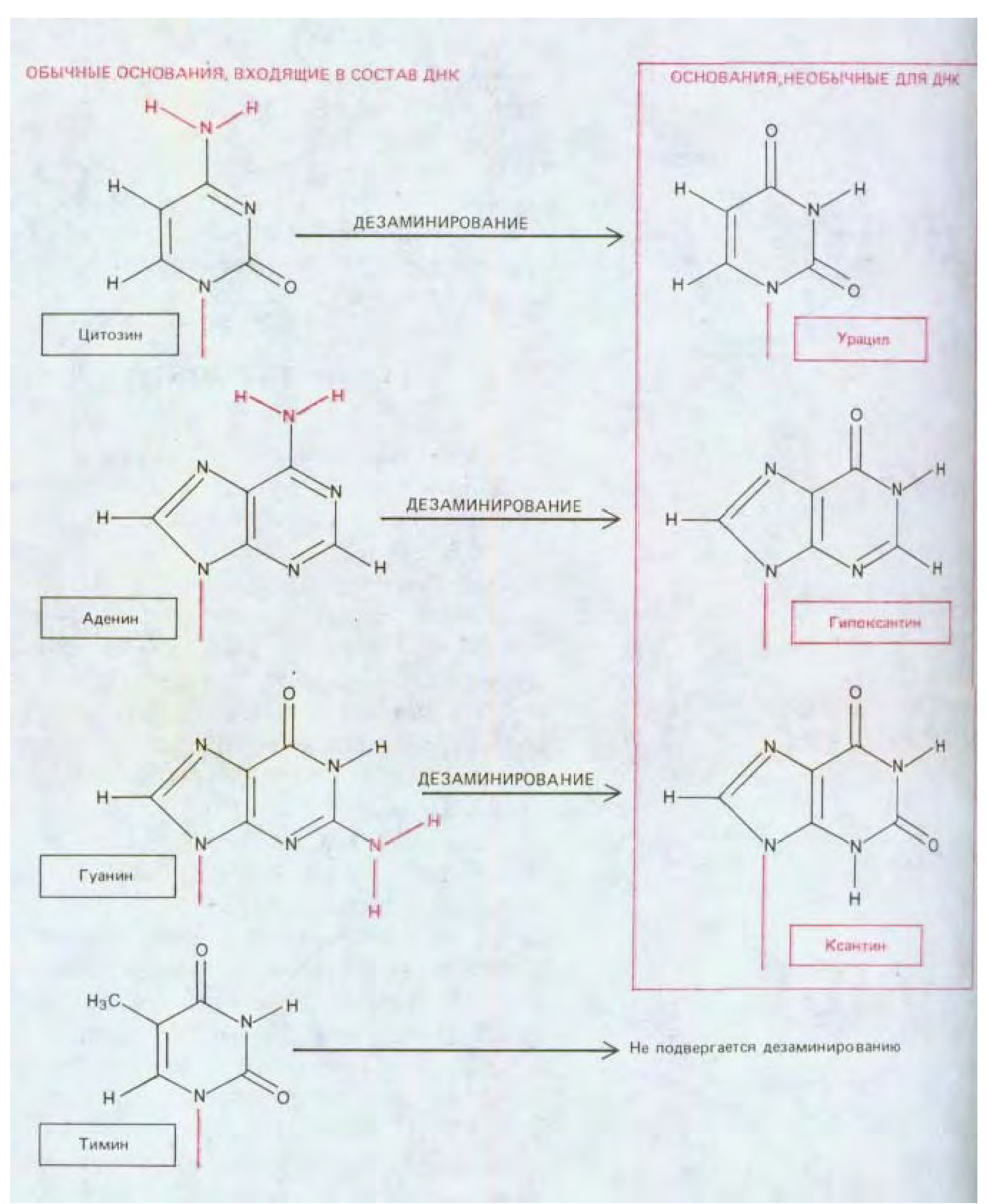


Рис. 5-37. Продукты спонтанного дезаминирования различных оснований ДНК. Все эти продукты дезаминирования необычны в составе ДНК и распознаются именно по этой причине.

Заключение

Судить о надежности сохранения нуклеотидных последовательностей ДНК у высших эукариот можно, исходя из скорости изменения аминокислотных последовательностей второстепенных белков и нуклеотидных последовательностей ДНК на протяжении эволюционного времени. Эта надежность столь велика, что за год в геноме млекопитающего, насчитывающем $3 \cdot 10^9$ *пар оснований, в среднем происходит всего лишь 10-20 замен оснований, затрагивающих клетки зародышевой линии. В то же время в геноме такого размера из-за неизбежных процессов химического распада ежедневно повреждаются тысячи нуклеотидов ДНК. Генетическая информация может надежно храниться в нуклеотидных последовательностях ДНК лишь потому, что широкий набор различных репарирующих ферментов осуществляет непрерывный «осмотр» ДНК и удаляет из нее поврежденные нуклеотиды.*

Процесс репарации ДНК основан на том, что генетическая информация представлена в этой молекуле двумя копиями - по одной в каждой из двух цепей двойной спирали ДНК. Благодаря этому случайное повреждение в одной из цепей может быть удалено репарирующим ферментом и данный участок цепи ресинтезирован в своем нормальном виде за счет информации, содержащейся в неповрежденной цепи.

5.3. Механизмы репликации ДНК [24]

Живые организмы должны не только поддерживать целостность нуклеотидных последовательностей ДНК путем ее репарации, но еще и очень точно воспроизводить свою ДНК перед каждым клеточным делением. При репликации ДНК скорость полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов в 1 с у бактерий приблизительно до 50 нуклеотидов у млекопитающих. Ясно, что ферменты, катализирующие процесс репликации, должны работать и точно, и быстро. Быстрота и точность достигаются с помощью особого мультиферментного комплекса, направляющего процесс репликации. Этот комплекс, состоящий из нескольких различных белков, представляет собой сложный и совершенный «аппарат репликации».

5.3.1. Репликация ДНК, как и ее репарация, основана на комплементарном спаривании оснований [25]

Матричная активность ДНК проявляется в том, что ее нуклеотидная последовательность копируется (целиком или частично) путем комплементарного спаривания оснований (А с Т или G с С) в виде комплементарной последовательности нуклеотидов ДНК или РНК. Этот процесс предполагает узнавание каждого нуклеотида в ДНК свободным (неполимеризованным) комплементарным нуклеотидом и обязательное разделение (хотя бы на время) двух цепей ДНК, с тем чтобы в каждом основании группы, играющие роль доноров и акцепторов при образовании водородных связей, оказались доступными для комплементарного спаривания. Таким образом поступающие одиночные нуклеотиды выстраиваются в определенном порядке вдоль матричной цепи ДНК для ферментативной полимеризации, продуктом которой является новая полинуклеотидная цепь. В 1957 г. был открыт первый фермент, катализирующий процесс полимеризации нуклеотидов; он был назван ДНК-полимеразой. Было показано, что субстратами ДНК-полимеразы служат дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, полимеризующиеся на одно-цепочечной ДНК-матрице (двухступенчатый механизм этой полимеризации представлен на рис. 5-34 в связи с обсуждением процесса репарации ДНК). Позже была выделена и *РНК-полимераза,* для которой субстратами служат рибонуклеозидтрифосфаты.

Во время репликации ДНК каждая из двух ее старых цепей служит матрицей для образования новой цепи. Поэтому чрезвычайно длинная нуклеотидная последовательность клеточной ДНК реплицируется, как это принято называть, «полуконсервативно» и каждая из двух дочерних клеток получает при клеточном делении новую двойную спираль ДНК, состоящую из одной старой и одной новой цепи (см. рис. 3-11).

5-23

5.3.2. Репликационная вилка асимметрична [26]

Исследования, проведенные в начале 1960-х годов на реплицирующихся хромосомах, в которые в качестве импульсной метки вводили радиоактивный предшественник ДНК ^{3}Н-тимидин, выявили особую четко ограниченную область репликации, перемещающуюся вдоль родительской спирали ДНК. Эта активная область из-за своей Y-образной формы была названа **репликационной вилкой.** Именно в ней с помощью мультиферментного комплекса, содержащего ДНК-полимеразу, синтезируются дочерние молекулы ДНК.

В то время казалось вполне вероятным, что простейший механизм репликации ДНК заключается в непрерывном росте обеих новых цепей

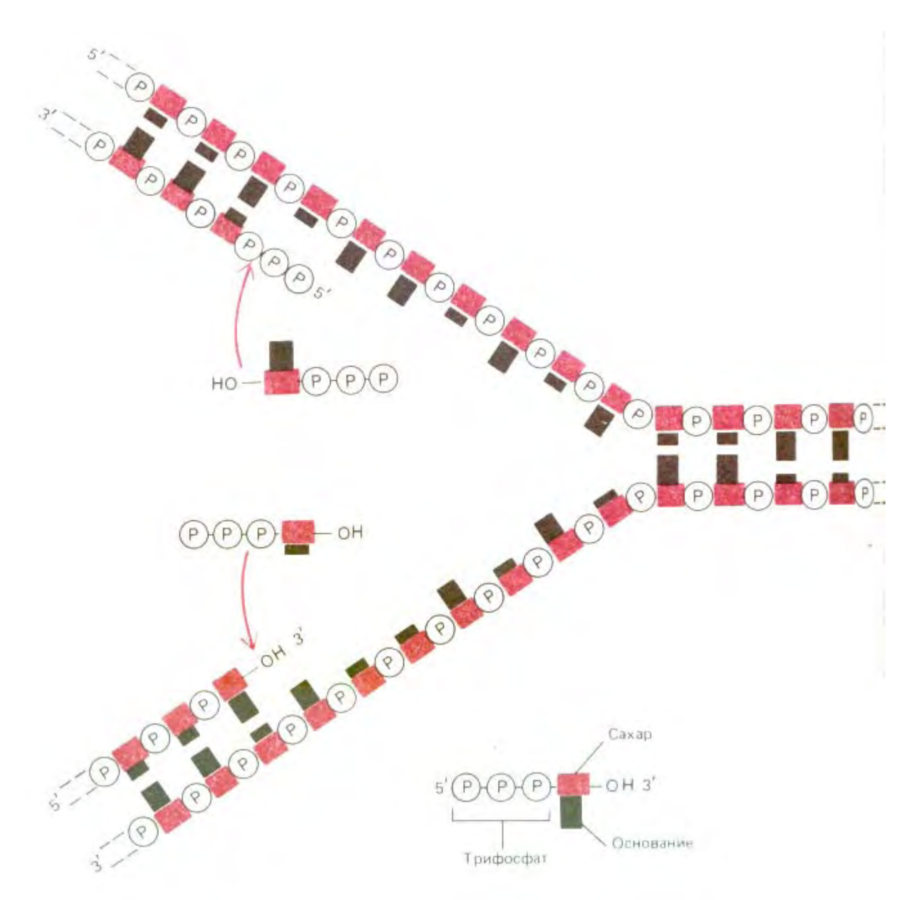


Рис. 5-38. На первый взгляд простейшим механизмом репликации ДНК представляется механизм, изображенный на этой (неверной!) схеме. Обе дочерние цепи должны были бы при этом расти непрерывно за счет присоединения нуклеотидов соответственно в 5' → 3' - направлении (на рисунке - внизу) и 3' → 5' - направлении (на рисунке - *вверху).* Однако фермента, который бы катализировал присоединение нуклеотидов в направлении 3' → 5', не существует.

нуклеотид за нуклеотидом по мере перемещения репликационной вилки от одного конца молекулы ДНК к другому. Однако, поскольку две цепи в спирали ДНК антипараллельны, одна из дочерних цепей должна расти в направлении 5' → 3', а другая - в направлении 3' → 5'. В таком случае репликационной вилке потребовалось бы две разные ДНК-полимеразы. Одна из них наращивала бы цепь в направлении 5' → 3' (рис. 5-34); при этом каждый поступающий мономер (дезоксирибонуклеозидтрифосфат) приносит с собой необходимую для его присоединения к цепи энергию (ее носителем является трифосфатная группа). Другая ДНК-полимераза, перемещающаяся в направлении 3' → 5', должна катализировать «рост с головы»; в этом случае энергию, необходимую для присоединения каждого очередного нуклеотида, должен нести конец растущей цепи ДНК. В действительности такой (3' → 5') ДНК-полимеразы не существует (рис. 5-38), хотя биохимикам известны некоторые другие процессы полимеризации, протекающие по типу «роста с головы» (см. рис. 2-34), Каким же образом происходит рост цепи в направлении 3' → 5'? Возможный ответ на этот вопрос подсказали в конце 1960-х годов эксперименты с радиоактивно меченными предшественниками ДНК. Если растущие клетки получают всего на несколько секунд высокорадиоактивный ^{3}H-тимидин, то метка включается лишь в ДНК, синтезированную в самый последний момент, т. е. в ту ее часть, которая следует непосредственно за репликационной вилкой. Этим методом избирательного введения метки было выявлено, что при репликации бактериальной ДНК в области репликационной вилки образуются и какое-то время существуют фрагменты, насчитывающие от 1000 до 2000 нуклеотидов (впоследствии за ними закрепилось название «фраг-

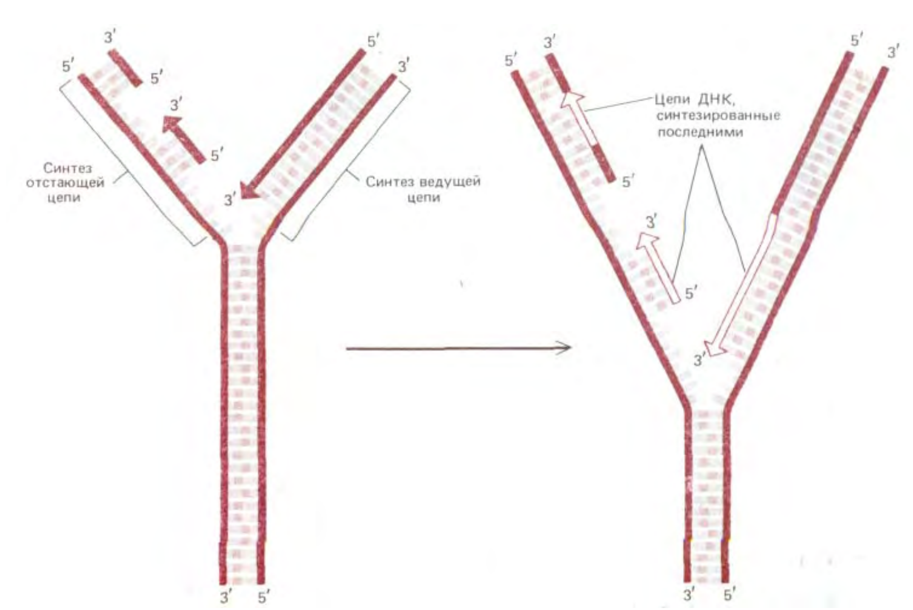


Рис. 5-39. Строение репликационной вилки. Обе дочерние цепи строятся в направлении 5' → 3'. Для этого отстающая цепь ДНК должна синтезироваться в виде ряда коротких фрагментов *(фрагменты Оказаки).*

менты Оказаки»; у эукариот они гораздо короче: от 100 до 200 нуклеотидов). Несколько позже было показано, что синтез этих фрагментов ДНК идет только в направлении 5' → 3'; синтезированные фрагменты соединяются затем в длинные цепи ДНК под действием того же фермента, который сшивает разрывы в спирали ДНК во время ее репарации, т.е. под действием ДНК-лигазы (см. рис. 5-35).

Репликационная вилка асимметрична (рис. 5-39). Из двух синтезируемых дочерних цепей ДНК одна строится непрерывной, а другая прерывистой. Первую называют **ведущей** (или **лидирующей),** а вторую - **отстающей.** Наращивание второй цепи отстает, потому что образование каждого фрагмента Оказаки оказывается возможным лишь после того, как продвижение ведущей цепи откроет соответствующий участок матрицы. Хотя в целом вся эта цепь строится в направлении 3' → 5', каждый из ее фрагментов синтезируется в направлении 5' → 3'. Благодаря тому что ДНК на отстающей части вилки строится при помощи механизма, работающего прерывисто по типу «шитья назад иголкой» (backstitching), в репликационной вилке не требуется никакого другого фермента, кроме (5' → 3')-ДНК-полимеразы.

5-24

5.3.3. Высокая точность репликации ДНК предполагает наличие механизма, осуществляющего коррекцию [27]

Точность копирования при репликации ДНК столь велика, что в среднем на каждые $1 \cdot 10^9$ комплементарных пар, образующихся в процессе воспроизведения генома млекопитающих, насчитывающего $3 \cdot 10^4$ пар оснований (см. разд. 9.1.3), приходится приблизительно одна ошибка. Точность эта значительно превосходит ту, какую следует ожидать, учитывая, что во время репликации образуются не только обычные комплементарные пары оснований. В нормальной ДНК возникают на короткое время с частотой 10^{-4}-10^{-5} редкие таутомерные формы всех четырех ее оснований. Эти формы образуют неправильные пары. Так, редкая таутомерная форма С спаривается с А вместо G, в результате чего возникает мутация (рис. 5-40). Таким образом высокая точность

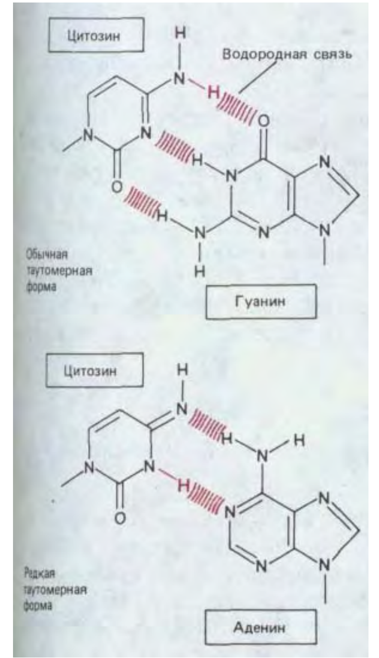


Рис. 5-40. Пример возникновения при репликации ДНК неправильной пары оснований: находясь в термодинамически невыгодной таутомерной форме, цитозин легко образует водородные связи с аденином.

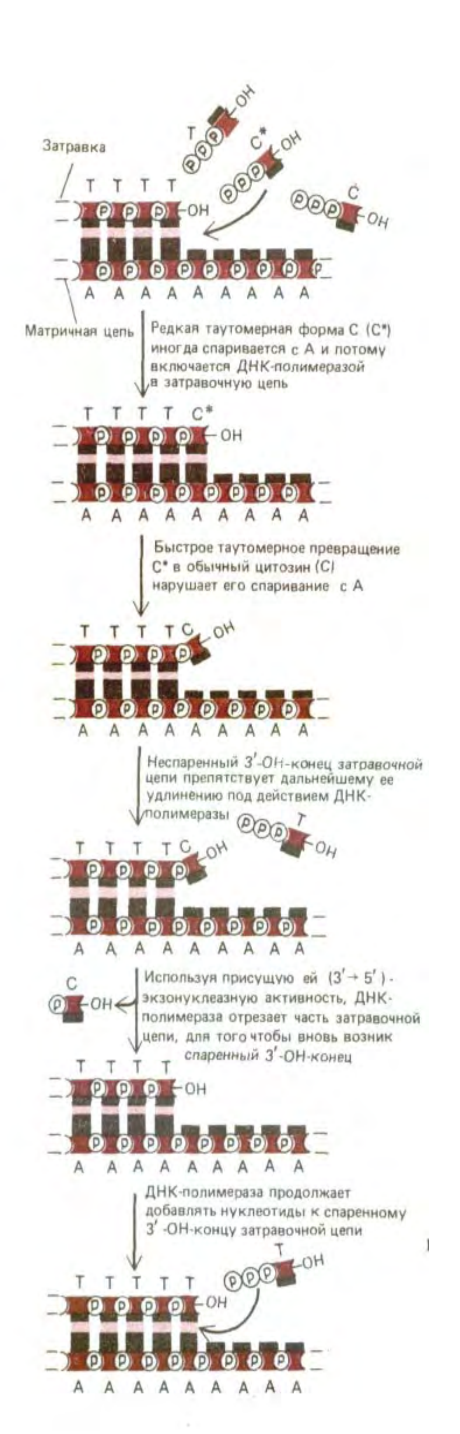


Рис. 5-41. Схема, поясняющая, как протекает процесс коррекции (устранение ошибок) при синтезе ДНК, катализируемом ДНК-полимеразами у бактерий. Предполагается, что аналогичный механизм коррекции действует и в эукариотических клетках.

репликации ДНК определяется наличием механизмов, осуществляющих коррекцию, т. е. устраняющих подобные ошибки.

Один из важных механизмов коррекции зависит от особых свойств ДНК-полимеразы. В отличие от РНК-полимераз ДНК-полимеразы не могут начать синтез новой полинуклеотидной цепи, просто связав друг с другом 3'-OH-конец какой-либо полинуклеотидной цепи, которая должна быть спарена с матричной цепью ДНК; ДНК-полимеразы способны только добавлять новые нуклеотиды к уже имеющемуся 3'-OH-концу полинуклеотидной цепи (см. рис. 5-34). Эту предобразованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют *затравкой* или *праймером.* Молекулы ДНК с затравкой, у которой 3'-OH-конец не спарен, не могут служить матрицами. Бактериальные ДНК-полимеразы способны, однако, с ними работать. Вступив в контакт с такими молекулами ДНК, они используют присущую им (3' → 5')-экзонуклеазную активность и отщепляют (путем гидролиза) любые неспаренные нуклеотиды на затравочном конце. Отщепляется ровно столько нуклеотидов, сколько требуется для того, чтобы у затравки появился спаренный конец и образовалась активная матрица. Действуя таким образом, ДНК-полимераза выступает в роли «самокорректирующего» фермента: она устраняет свои собственные ошибки, возникающие в процессе полимеризации. Рис. 5-41 поясняет, как этот тип коррекции может использоваться для удаления неправильных пар C—A, образуемых редкой таутомерной формой цитозина.

Потребность в правильно спаренном конце как раз и наделяет ДНК-полимеразу способностью исправлять свои собственные ошибки. Такой фермент, очевидно, мог бы начать синтез ДНК при полном отсутствии затравки, только утратив способность различать спаренный и неспаренный концы. В то же время РНК-полимеразы, участвующие в транскрипции генов (см. разд. 5.1.1), судя по всему не нуждаются в самокоррекции, потому что ошибки транскрипции не передаются следующему поколению и случайно возникшие дефектные молекулы особой роли не играют. РНК-полимеразы могут начинать синтез новых полинуклеотидных цепей в отсутствие затравки, причем ошибки встречаются с частотой 10^{-4} как при синтезе РНК, так и при трансляции, т.е. при переводе нуклеотидных последовательностей мРНК в аминокислотные последовательности белков.

5-22

5.3.4. Репликация ДНК в направлении 5' → 3' обеспечивает эффективную коррекцию

Весьма вероятно, что однонаправленность репликации ДНК (5' → 3') объясняется высокими требованиями к точности процесса. Если бы существовала ДНК-полимераза, присоединяющая дезоксирибонуклеозидтрифосфаты к синтезируемой полинуклеотидной цепи таким образом, что эта цепь росла в направлении 3' → 5', то активирующую трифосфатную группировку нес бы растущий 5'-конец цепи, а не поступающий мононуклеотид. В этом случае ошибки полимеризации не могли бы устраняться простым гидролизом, потому что появление свободного 5'-конца немедленно обрывало бы синтез ДНК. Ясно, что основание, только что неправильно спарившееся на 3'-конце, устранить гораздо легче, чем такое же основание, присоединившееся к 5'-концу

цепи ДНК. Поэтому, хотя механизм репликации ДНК, изображенный на рис. 5-39, кажется на первый взгляд значительно более сложным и громоздким, чем неверный гипотетический механизм, представленный на рис. 5-38, этот реально функционирующий механизм способен обеспечить гораздо большую точность именно в силу того, что синтез ДНК идет здесь только в направлении 5' → 3'.

5-25

5.3.5. Для синтеза коротких затравочных молекул на матрице отстающей цепи требуется особый фермент [28]

С того момента, как возникла репликационная вилка, для ДНК-полимеразы, синтезирующей ведущую цепь, всегда есть спаренный 3'-конец, необходимый ей для того, чтобы начать синтез новой цепи. Иначе обстоит дело с ДНК-полимеразой, ответственной за синтез отстающей цепи. Ей требуется всего каких-нибудь 4 с для того, чтобы синтезировать один короткий фрагмент ДНК, после чего она должна переключиться на синтез совсем другого фермента на новом участке матричной цепи, расположенной на некотором расстоянии от первого (см. рис. 5-39). Для этого ей всякий раз нужна затравка со спаренным 3'-концом, а следовательно, нужен и механизм, способный производить такие затравки. В этот механизм входит фермент, называемый *ДНК-праймазой.* Она синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов короткие **РНК-затравки (праймеры),** состоящие у эукариот примерно из 10 нуклеотидов (рис. 5-42). Эти затравки синтезируются с определенными интервалами на матрице для отстающей цепи; здесь их наращивает ДНК-полимераза, начиная, таким образом, всякий раз новый фрагмент Оказаки. Молекула ДНК-полимеразы продолжает это наращивание до тех пор, пока она не достигнет РНК-затравки, присоединенной к 5'-концу предыдущего фрагмента ДНК. Чтобы обеспечить образование непрерывной цепи ДНК из многих таких фрагментов, в действие вступает особая система репарации ДНК, быстро удаляющая РНК-затравку и заменяющая ее на ДНК. Завершает процесс ДНК-лигаза, соединяющая 3'-конец нового фрагмента ДНК с 5'-концом предыдущего фрагмента (рис. 5-43).

Почему предпочтение отдается удаляемой РНК-затравке, а не ДНК-затравке, которую не требовалось бы удалять? Выше мы отмечали, что самокорректирующая полимераза не способна начинать синтез полинуклеотидных цепей de novo; это предполагает и обратное утверждение: тот фермент, который начинает синтез цепей de novo, к эффективной самокоррекции не способен. Значит, любой фермент, катализирующий инициацию синтеза фрагментов Оказаки, неизбежно создал бы не слишком точную копию (не менее 1 ошибки на 10^5). Это означало бы колоссальное увеличение частоты мутаций даже при том, что количество

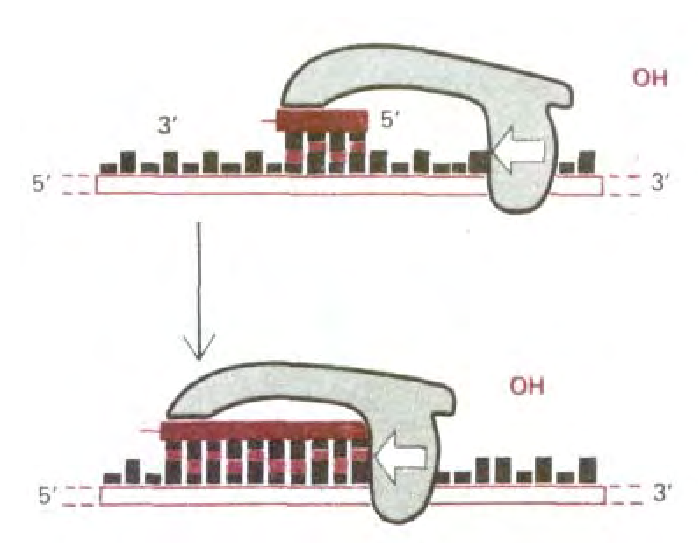


Рис. 5-42. Схема реакции, катализируемой праймазой - ферментом, синтезирующим короткие РНК-затравки в отстающей цепи ДНК. В отличие от ДНК-полимеразы этот фермент способен начинать синтез новой полинуклеотидной цепи с соединения двух нуклеозидтрифосфатов. Образовав короткий полинуклеотид, праймаза прекращает работу. Теперь к свободному 3'-концу может добавлять нуклеотиды ДНК-полимераза.

таких копий, сохранившееся в конечном продукте, составляло бы не более 5% всего генома (например, 10 нуклеотидов во фрагменте, состоящем из 200 нуклеотидов). Естественно думать поэтому, что выдвижение РНК, а не ДНК на роль затравки обеспечивало важное преимущество, поскольку рибонуклеотиды автоматически метят такие последовательности, как «плохие копии», которые должны быть удалены.

5-26
5-33

5.3.6. Особые белки способствуют расплетанию двойной спирали ДНК перед репликационной вилкой [29]

Двойная спираль ДНК должна расплетаться по ходу продвижения репликационной вилки, для того чтобы поступающие дезоксирибонуклеозидтрифосфаты могли спариваться с родительской матричной цепью, Однако в обычных условиях двойная спираль ДНК весьма стабильна; спаренные основания соединены столь прочно, что для разделения двух цепей ДНК в пробирке требуются температуры, приближающиеся к точке кипения воды (90°С). По этой причине большинство ДНК-полимераз может копировать лишь ту молекулу ДНК, у которой матричная цепь уже отделилась от другой цепи. Для того чтобы двойная спираль ДНК раскрылась и соответствующая матричная цепь стала доступной для ДНК-полимеразы, необходимы особые белки. Они бывают двух типов.

ДНК-геликазы были впервые выделены как белки, которые, присоединяясь к одиночной цепи ДНК, катализируют гидролиз АТР. Как уже отмечалось в гл. 3, гидролиз АТР может циклическим образом изменять форму молекулы белка, вследствие чего белок будет производить механическую работу (см. разд. 3.4.11). Именно этот принцип лежит в основе быстрого перемещения ДНК-геликаз по одиночной цепи ДНК. Встречая на своем пути участок двойной спирали, эти ферменты продолжают двигаться вдоль своей цепи и тем самым расплетают двойную спираль (рис. 5-44). Расплетание ДНК-спирали в области репликационной вилки, вероятно, осуществляется двумя совместно действующими ДНК-геликазами, одна из которых перемещается по ведущей цепи, а другая - по отстающей. Ясно, что две эти геликазы должны двигаться вдоль одиночных цепей ДНК в противоположных направлениях, т. е. это должны быть разные ферменты. Действительно, оба указанных типа ДНК-геликаз удалось обнаружить. При этом исследования на бактериях показали, что главную роль играет ДНК-геликаза отстающей цепи. Причины этого мы обсудим ниже.

Белки, **дестабилизирующие** спираль (их называют также белками, связывающими одноцепочечную ДНК или SSB-белками), связываются с одиночными цепями ДНК, не закрывая оснований, т. е. оставляя их доступными для спаривания. Сами они не способны расплетать длинные молекулы ДНК, но, присоединяясь к одиночным цепям ДНК, они тем самым способствуют любому процессу расплетания спирали; они, например, помогают ДНК-геликазе расплетать двойную спираль в репликационной вилке. На матрице отстающей цепи SSB-белки кооперативным образом связываются с одноцепочечными участками ДНК и предотвращают здесь образование «шпилек», небольших двухспиральных структур, которые могли бы помешать синтезу ДНК, осуществляемому ДНК-полимеразой (рис. 5-45).



Рис. 5-43. Отдельные этапы синтеза каждого из фрагментов отстающей цепи ДНК. У эукариот РНК-затравки синтезируются в отстающей цепи с интервалами приблизительно в 200 нуклеотидов и каждая из них состоит из 10 нуклеотидов.

5.3.7. Белки в репликационной вилке действуют кооперативно, образуя «репликационную машину» [30]

До сих пор мы говорили о репликации ДНК так, как если бы она осуществлялась смесью репликационных белков, действующих независимо друг от друга. Между тем в действительности большая часть этих белков объединена в крупный мультиферментный комплекс, быстро движущийся вдоль ДНК. Этот комплекс - нечто вроде крошечной «швейной машины»: «деталями» его служат отдельные белки, а источником энергии - реакция гидролиза нуклеозидтрифосфата. Комплекс изучен достаточно хорошо только у бактерий *E. coli* и у некоторых вирусов, но есть все основания считать, что очень похожий механизм действует и у эукариот (см. разд. 9.3.3).

Схема на рис. 5-46, где подробно изображена репликационная вилка, позволяет судить о том, как работают отдельные части такой «репликационной машины». В области вилки действуют две идентичные ДНК-полимеразы - на ведущей и на отстающей цепи. Спираль ДНК расплетается в результате совместного действия ДНК-полимеразы, работающей на ведущей цепи, и ДНК-геликазы, движущейся вдоль отстающей цепи; этому процессу способствуют кооперативно связывающиеся молекулы дестабилизирующегося белка. В то время как на ведущей цепи ДНК-полимераза работает непрерывно, на отстающей цепи фермент через определенные интервалы прерывает и вновь возобновляет свою работу, используя для полимеризации короткие РНК-затравки, синтезируемые ДНК-праймазой.

Эффективность репликации сильно возрастает вследствие тесного объединения всех этих белковых компонентов. Молекула праймазы непосредственно сцеплена с ДНК-геликазой, образуя вместе с нею на отстающей цепи структуру, называемую **праймосомой,** которая движется с репликационной вилкой и по ходу своего движения синтезирует РНК-затравки. Молекула ДНК-полимеразы, работающая на отстающей цепи, также движется совместно с остальными белками, синтезируя ряд новых фрагментов Оказаки; ради этого, как полагают, цепь ДНК, которая служит для нее матрицей, складывается сама на себя, как это показано на рис. 5-47. Репликационные вилки оказываются, таким образом, объединены в одну крупную структуру (с общей массой > 10^6 дальтон), быстро перемещающуюся вдоль ДНК и обеспечивающую

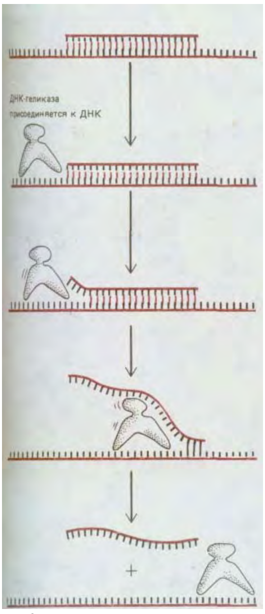


Рис. 5-44. Действие ДНК-геликаз. Небольшой фрагмент ДНК присоединен путем отжига к длинной одноцепочечной ДНК, так что образовался короткий участок двойной спирали. Эта спираль расплетается по мере того, как геликаза движется вдоль одиночной цепи ДНК, катализируя реакцию, для которой требуется наряду с ферментом и АТР. Источником энергии для движения геликазы служит гидролиз АТР (см. рис. 3-63).

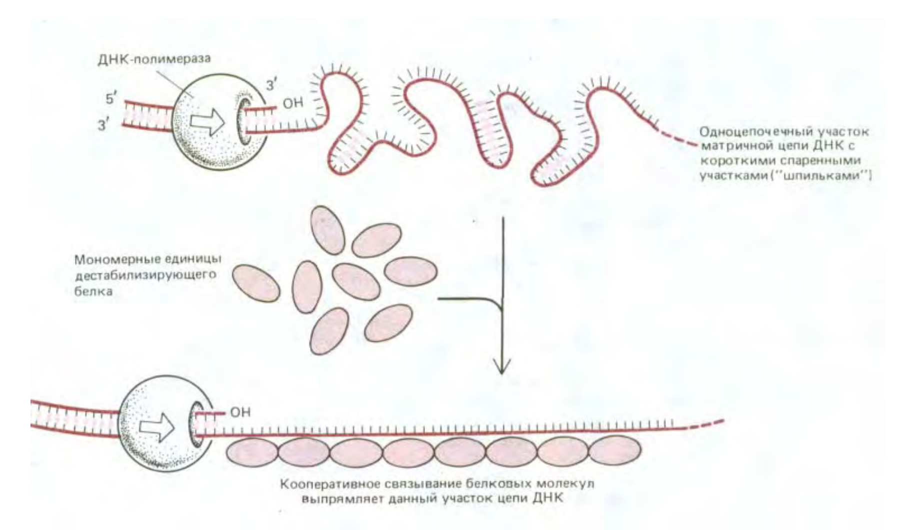


Рис. 5-45. Влияние дестабилизирующих белков на структуру одно-цепочечной ДНК. Поскольку каждая белковая молекула предпочитает связываться с другой, уже связавшейся ранее молекулой (так называемое *кооперативное связывание),* эти белки образуют длинные кластеры, выпрямляющие матричные пени ДНК и облегчающие процесс полимеризации. Структуры в форме «шпильки», возникающие в свободной одноцепочечной ДНК, образуются путем случайного спаривания оснований в коротких участках, содержащих взаимно комплементарные последовательности нуклеотидов, они напоминают короткие спирали, возникающие во всех молекулах РНК.

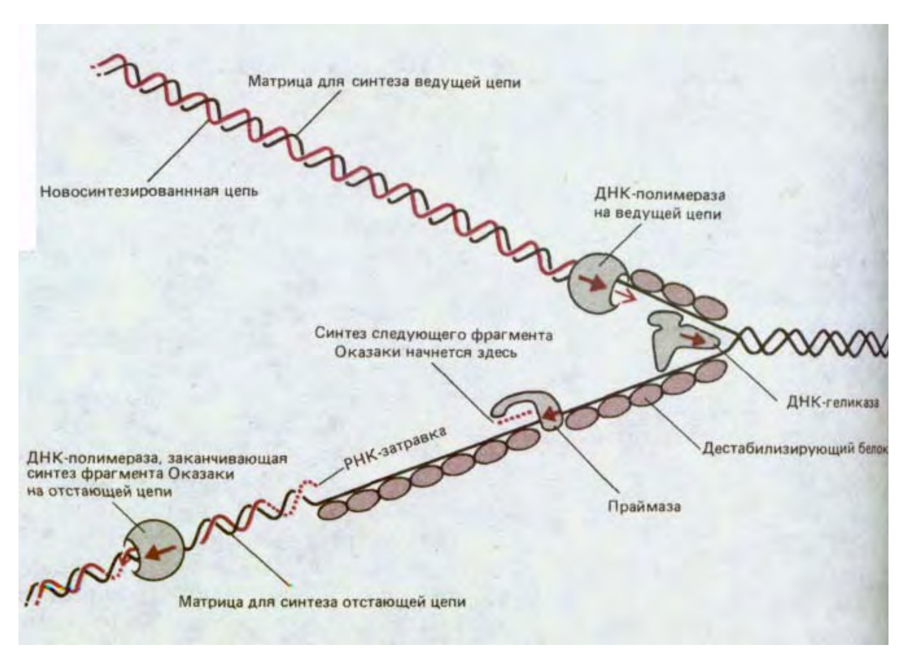


Рис. 5-46. Главные типы белков, действующих в области репликационной вилки (схема показывает их локализацию на ДНК). Комплекс ДНК-праймазы и ДНК-геликазы на отстающей цепи ДНК известен под названием *праймосомы.*

возможность координированного и эффективного синтеза ДНК на обет ветвях вилки.

Позади «репликационной машины» по ходу ее движения остается на отстающей цепи ряд несшитых фрагментов Оказаки, все еще содержащих на своем 5'-конце РНК-затравки, необходимые для инициации на синтеза. Эти РНК-затравки должны быть удалены, а фрагменты сшиты при помощи репарирующих ферментов, работающих позади репликационной вилки (см. рис. 5-43).

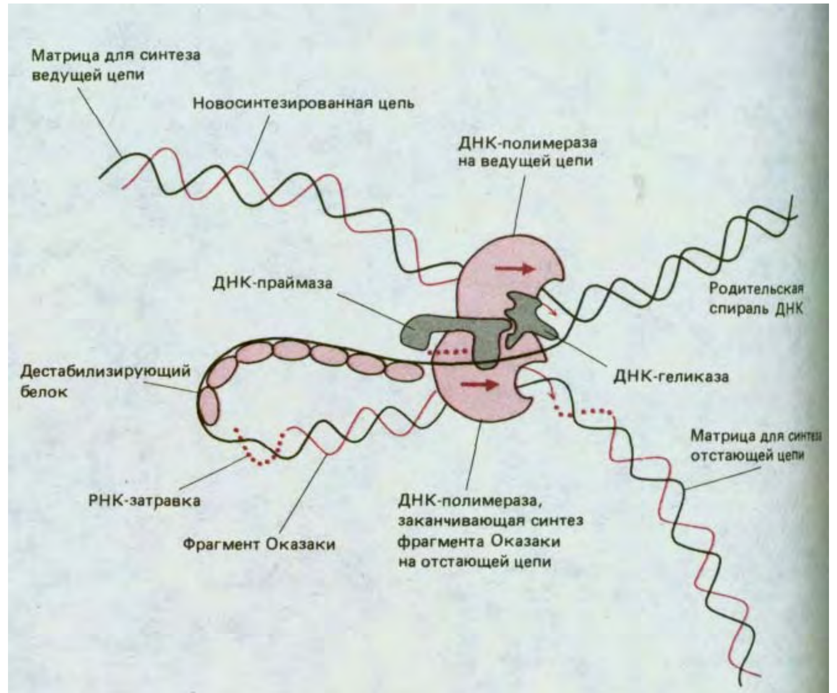


Рис. 5-47. Схема, иллюстрирующая современные представления о расположении репликационных белков в движущейся репликационной вилке. Вместо двумерной структуры, изображенной на рис. 5-46, здесь показано, как ДНК на отстающей цепи складывается, в результате чего возникает комплекс из двух ДНК-полимераз - ведущей и отстающей цепи. Кроме того, благодаря складыванию 3'-конец каждого завершенного фрагмента Оказаки оказывается рядом со стартовым участком следующего такого фрагмента (ср. с рис. 5-46). Находясь в тесном контакте с остальными репликационными белками, молекула ДНК-полимеразы отстающей цепи может непрерывно работать на одной и той же репликационной вилке, отделяясь от готового фрагмента ДНК, она переходит к ближайшей новой РНК-затравке, чтобы начать синтез следующего фрагмента. Обратите внимание, что на этой схеме одна из дочерних спиралей ДНК направлена вправо и вниз, а вторая влево и вверх.

5.3.8. Ошибки при репликации ДНК в бактериальных клетках устраняются особой корректирующей системой, распознающей неправильное спаривание оснований

У таких бактерий, как *E. coli,* деление происходит каждые 30 мин, поэтому у них сравнительно легко выявить в большой популяции клеток редкие экземпляры с измененными признаками. Выделен, например, класс мутантов, характеризующихся резким повышением частоты спонтанных мутаций, что связано с присутствием в его клетках специфических генов-мутаторов. Известен ген-мутатор, кодирующий дефектную форму 3' → 5'-корректирующей экзонуклеазы, представляющей собой субъединицу ДНК-полимеразы (см. разд. 5.3.3). Если дефект затрагивает этот белок, то ДНК-полимераза утрачивает способность эффективно осуществлять коррекцию и в ДНК накапливается много ошибок, которые при нормальной репликации были бы устранены.

Изучение тех мутантов *E. coli, у* которых имеются гены-мутаторы, выявило еще одну систему, в норме устраняющую ошибки репликации, не улавливаемые корректирующей экзонуклеазой. Эта система **коррекции неправильного спаривания** (mismatch proofreading sistem), называемая также *системой исправления ошибок спаривания* (mismatch repair system), отличается от ранее рассмотренных систем репарации ДНК тем, что она не зависит от присутствия в ДНК аномальных нуклеотидов, которые должны быть распознаны и удалены («вырезаны»). Она выявляет деформации на внешней стороне спирали, вызванные плохой пригонкой обычных, но некомплементарных оснований. Если бы эта корректирующая система просто распознавала ошибки спаривания в реплицировавшейся ДНК и удаляла без выбора один из двух неправильно спарившихся нуклеотидов, то в половине случаев она бы сама совершала ошибку, «исправляя» не новосинтезированную, а матричную цепь, так что в среднем частота ошибок оставалась бы прежней. Для эффективной коррекции система должна уметь различать неправильно спаривающиеся нуклеотиды и избирательно удалять такие нуклеотиды только из новой цепи (т.е. устранять именно ошибки репликации).

В клетках *E. coli* процесс распознавания связан с метилированием определенных остатков аденина в ДНК. Метальные группы присоеди-

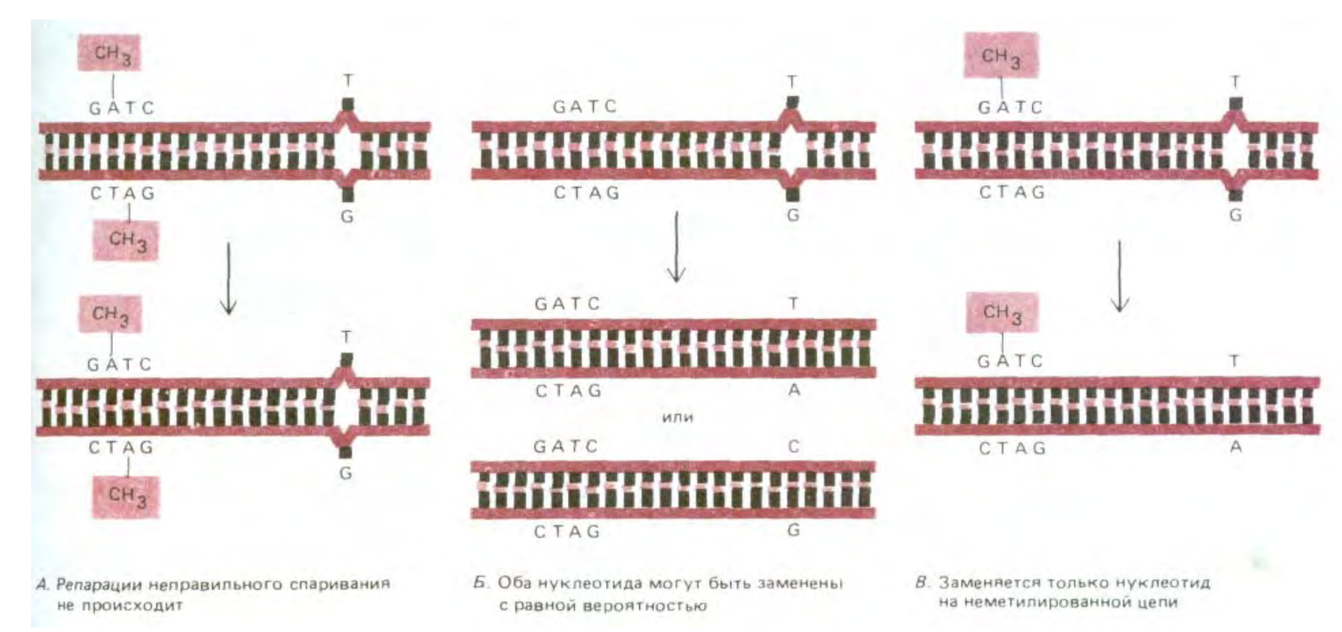


Рис. 5-48. Схема эксперимента, иллюстрирующего работу системы коррекции неправильного спаривания, устраняющей у бактерий ошибки репликации ДНК. Особый белковый комплекс удаляет неспаренные нуклеотиды из вновь синтезируемой цепи ДНК позади репликационной вилки, этот репарирующий комплекс узнает новую цепь ДНК по обнаруживаемым в ней неметилированным последовательностям GATC. На схеме представлены три молекулы ДНК с одной и той же «неправильной» парой нуклеотидов, но при этом в одной молекуле *(А)* метилированные последовательности GATC встречаются в обеих цепях, в другой молекуле *(Б)* таких метилированных последовательностей нет совсем, а в третьей *(В)* они присутствуют только в одной из цепей. Если воздействовать на эти молекулы ДНК клеточным экстрактом, содержащим корректирующий комплекс, то мы получим представленный здесь результат. Молекула ДНК в правой части рисунка воспроизводит картину, обнаруживаемую непосредственно за репликационной вилкой: нижняя цепь соответствует новой цепи, где метилирование еще не произошло.

няются ко всем остаткам А в последовательности GATC, но лишь спустя некоторое время после того, как А включится в новосинтезированную цепь ДНК. Новые цепи отличаются от старых тем, что только в них сразу же за репликационной вилкой могут находиться еще не метилированные последовательности GATC. Коррекция неправильного спаривания осуществляется крупным мультиферментным комплексом, сканирующим каждую из двух цепей двойной спирали ДНК. Этот комплекс удаляет только неправильно присоединенные нуклеотиды, но делает это лишь после того, как на той же цепи обнаружится и неметилированная последовательность GATC. Поэтому нуклеотиды удаляются только из новой цепи, т. е. устраняются ошибки репликации (рис. 5-48).

В эукариотических клетках не удалось пока выявить ни одного из этих двух механизмов коррекции, обнаруженных у бактерий. Однако степень точности репликации у млекопитающих и у *E. coli* приблизительно одинакова, и потому можно думать, что оба описанных типа коррекции существуют и у эукариот. Следует, впрочем, отметить, что в ДНК млекопитающих нет метилированных остатков А, поэтому механизм, который используется системой репарации ошибок спаривания для узнавания новосинтезированной цепи, должен быть в данном случае иным.

5-27

5.3.9. Репликационные вилки возникают в точках начала репликации [32]

И у бактерий, и у млекопитающих образование репликационных вилок начинается с возникновения особой структуры, называемой **репликационным глазком** (replication bubble). Это небольшой участок, в котором две цепи родительской спирали ДНК отделились одна от другой и были использованы в качестве матриц для синтеза ДНК (рис. 5-49). Для бактерий и некоторых вирусов, размножающихся в эукариотических клетках, удалось показать, что репликационный глазок образуется в тех местах молекулы ДНК, где находятся специфические нуклеотидные последовательности, получившие название **точек начала репликации.** Эти последовательности состоят приблизительно из 300 нуклеотидов. Предполагают, что аналогичные точки начала репликации существуют и в эукариотических хромосомах, однако надежных доказательств этого пока нет (см. разд. 9.3.2).

Процесс возникновения репликационных вилок удалось в некоторых случаях воспроизвести in vitro. Эти опыты показали, что у бактерий и бактериофагов инициация репликационных вилок начинается так, как это представлено на рис. 5-50. Множество копий *инициаторного белка* связываются с особыми участками в точке начала репликации, образуя крупный белковый комплекс. Этот комплекс присоединяет затем ДНК-геликазу и помещает ее на свободную одиночную цепь ДНК в прилегающем участке спирали. Присоединяется также ДНК-праймаза, т. е. образуется праймосома, которая, двигаясь от точки начала репликации, синтезирует РНК-затравку, что дает возможность начать синтез первой цепи ДНК. Остальные белки быстро объединяются после этого в два репликационных белковых комплекса, которые теперь движутся от точки начала репликации в противоположных направлениях (см. рис. 5-49); они продолжают синтезировать ДНК до тех пор, пока обе вилки не пройдут путь по матрице до самого конца.

Некоторые дополнительные данные, касающиеся инициации репликационных вилок в хромосомах эукариот, мы обсудим в гл. 9, там, где речь пойдет о клеточном ядре.

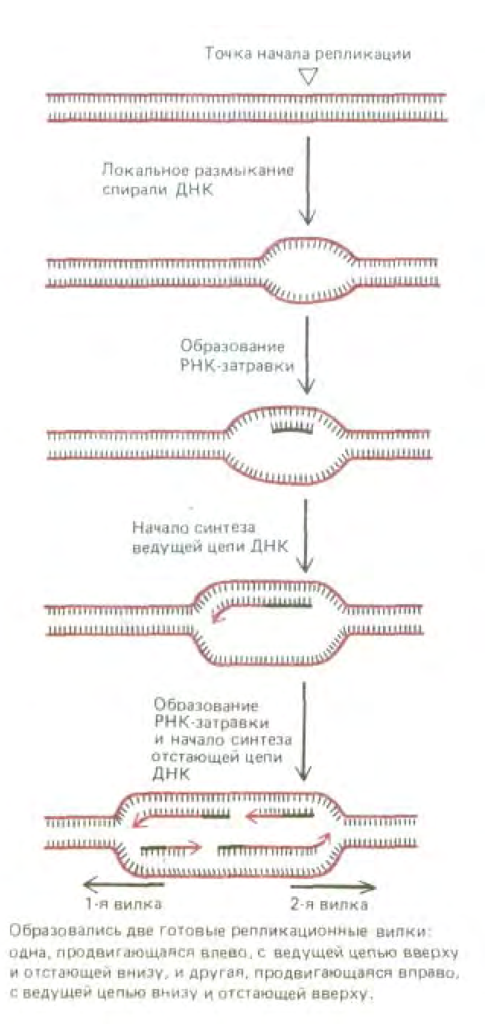


Рис. 5-49. Гипотетический механизм образования репликационных вилок в точках начала репликации (см. также рис. 5-50).

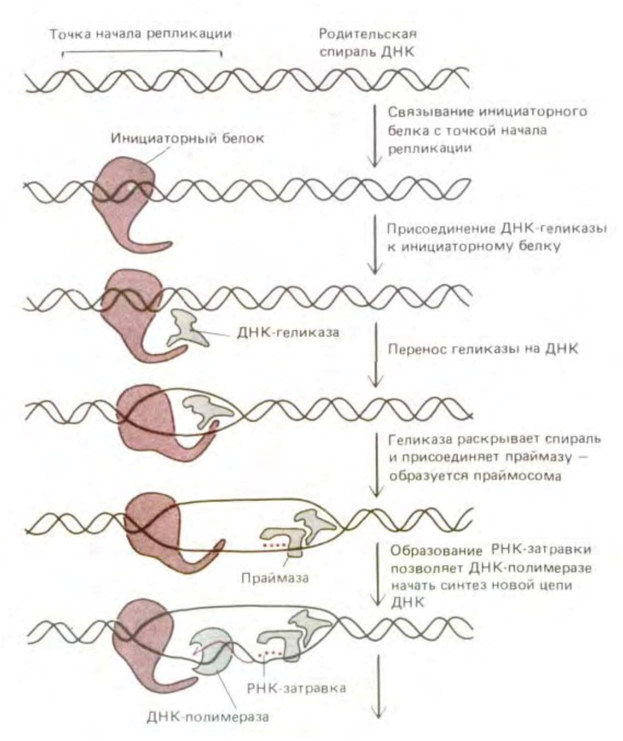


Рис. 5-50. Упрощенная схема, иллюстрирующая начальные этапы образования репликационных вилок в точках начала репликации у *E.* coli и бактериофага *λ*. Для обнаружения данного механизма потребовались опыты in vitro с использованием смеси высокоочищенных белков. Последующие этапы приводят (пока не ясным путем) к инициации еще трех цепей ДНК (рис. 5-49). У E. *coli* в репликации ДНК роль инициаторного белка играет белок dnaA; а праймосома состоит из белков dnaB (ДНК-геликаза) и dnaG (ДНК-праймаза).

5.3.10. ДНК-топоизомеразы предотвращают спутывание ДНК во время репликации [33]

Изображая спираль ДНК так, как мы это делали до сих пор, т.е. неправильно, в виде плоской «лестницы», мы игнорировали «проблему закручивания» (winding problem). Между тем на каждые 10 пар оснований, образующихся в репликационной вилке, родительская двойная спираль должна совершить один полный оборот вокруг своей оси. Следовательно, для того чтобы репликационная вилка могла продвигаться вперед, вся хромосома впереди нее должна быстро вращаться (рис. 5-51), что для длинных хромосом потребовало бы большой затраты энергии. При репликации ДНК эта проблема решается иначе: путем образования в спирали своего рода «шарнира», особого класса белков, называемых **ДНК-топоизомеразами.**

ДНК-топоизомераза представляет собой нечто вроде «обратимой нуклеазы». Сначала она разрывает цепь ДНК, а затем ковалентно присоединяется к разорванному концу. Ковалентная связь белок — ДНК обладает довольно значительной энергией, потому что в ней сохраняется энергия разорванной фосфодиэфирной связи. Вследствие этого реакция, приводящая к разрыву цепи, обратима и не требует дополнительной затраты энергии. В этом отношении данный механизм существенно отличается от механизма действия ДНК-лигазы, о котором мы говорили выше (см. рис. 5-35).

Существуют различные типы ДНК-топоизомераз. Топоизомераза типа I разрывает только одну из двух цепей двойной спирали ДНК, что дает возможность двум участкам ДНК по обе стороны от разрыва



Рис. 5-51. *«Проблема кручения», возникающая при репликации ДНК. Для того чтобы репликационная вилка (у бактерий) могла продвигаться вперед со скоростью 500 нуклеотидов в 1 с, родительская спираль ДНК перед вилкой должна вращаться со скоростью 50 об/с.*

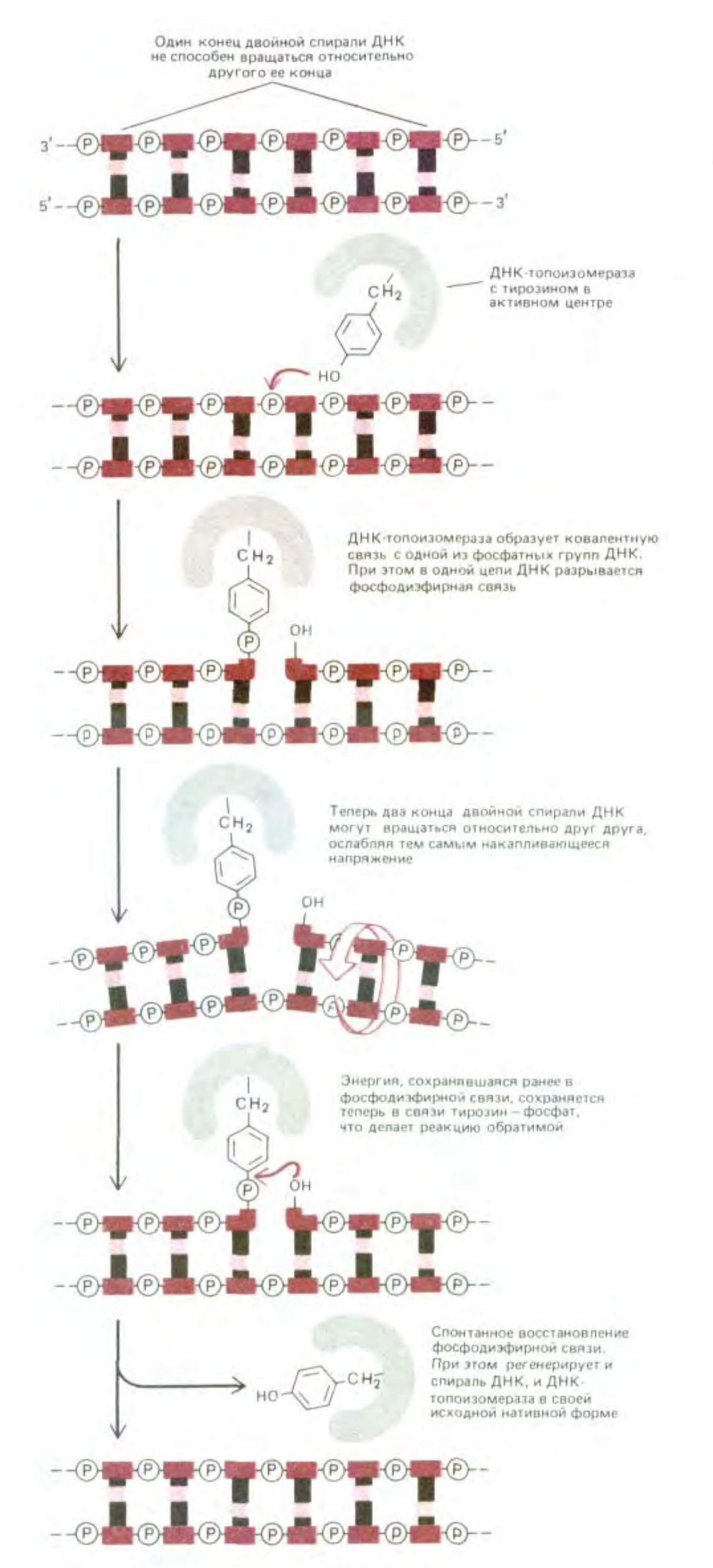


Рис. 5-52. Обратимая реакция, приводящая к появлению разрыва в одной из цепей ДНК. Реакция у эукариот катализируется ДНК-топоизомеразой типа I Ферменты этой группы образуют временную ковалентную связь с ДНК.

свободно вращаться относительно друг друга вокруг фосфодиэфирной связи, находящейся напротив разрыва, которая в этом случае выполняет роль упомянутого выше «шарнира» (рис. 5-52). Всякое напряжение в спирали ДНК заставляет ее вращаться в таком направлении, чтобы ослабить это напряжение. Поэтому вращение во время

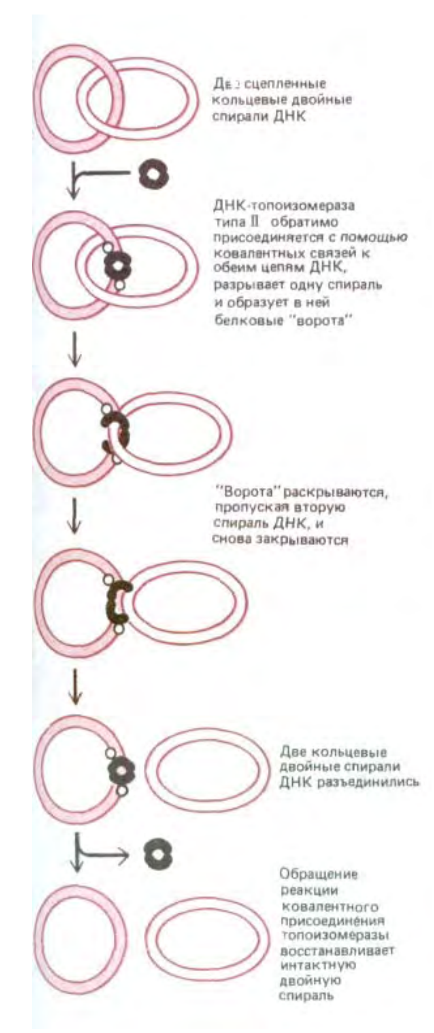


Рис. 5-53. Пример реакции разделения двух сцепленных кольцевых молекул ДНК, катализируемой ДНК-топоизомеразой типа II. Действие этих ферментов (в отличие от реакций, катализируемых ДНК-топоизомеразами типа I) сопряжено с гидролизом АТР и некоторые из них способны сообщать спирали ДНК дополнительное напряжение. ДНК-топоизомеразы типа II обнаруживаются и у прокариот, и у эукариот, по всей вероятности, они участвуют во многих реакциях, имеющих отношение к ДНК.

репликации ДНК происходит лишь на коротком отрезке спирали - в той части, которая находится непосредственно перед репликационной вилкой. Аналогичная проблема, возникшая в процессе транскрипции ДНК, решается таким же путем.

Топоизомераза *типа II* ковалентно связывается с обеими цепями двойной спирали ДНК и вносит в нее на время двухцепочечный разрыв. Ферменты этого типа активируются под действием тех участков на хромосомах, где перекрестились спирали. Присоединившись к такому перекресту, топоизомераза: 1) обратимо разрывает одну из двух двойных спиралей, создавая тем самым для другой своего рода «ворота», 2) вынуждает вторую двойную спираль пройти через этот разрыв и 3) сшивает обе разорванные цепи, а затем отделяется от ДНК. Действуя подобным образом, топоизомеразы типа II очень быстро разделяют две сцепленные кольцевые молекулы ДНК (рис. 5-53). Точно так же предотвращают они и спутывание молекул ДНК, которое в противном случае неизбежно создавало бы при репликации серьезную проблему. Известны температурочувствительные мутанты дрожжей, вырабатывающие топоизомеразу II, которая при 37°С инактивируется. Если нагреть эти дрожжевые клетки до такой температуры, то их хромосомы в процессе митоза остаются спутанными и не могут разойтись. Насколько необходим для распутывания хромосом такой «инструмент», как топоизомераза II, поймет каждый, кто хоть раз пытался распутать безнадежно запутавшуюся леску, не имея под рукой ножниц.

5-28

5.3.11. Репликация ДНК у эукариот и прокариот в основных чертах сходна [24]

Почти все, что мы знаем о репликации ДНК, удалось выяснить в опытах с очищенными мультиферментными системами бактерий и бактериофагов, способными осуществлять репликацию ДНК in vitro. Получение таких систем в 1970-х годах заметно облегчилось после того, как удалось выделить мутанты по целому ряду различных генов, ответственных за репликацию, которые можно было использовать для идентификации и очистки соответствующих белков (рис. 5-54).

У эукариот энзимология репликации ДНК пока еще детально не изучена, главным образом потому, что получать здесь необходимые мутантные формы гораздо труднее. Однако схема репликации у прокариот и эукариот в основных чертах, включая геометрию репликационной вилки и потребность в РНК-затравке, по-видимому, одинакова. Главное различие заключается в том, что у эукариот ДНК реплицируется не как таковая, а в виде *хроматина,* в котором она прочно связана с белками, принадлежащими к классу *гистонов.* В гл. 8 мы узнаем, что гистоны образуют комплексы в форме дисков, вокруг которых обвивается эукариотическая ДНК, в результате чего возникают регулярно повторяющиеся структуры, называемые *нуклеосомами.* Нуклеосомы располагаются вдоль молекулы ДНК с интервалами 200 пар оснований. Быть может, именно этим объясняется тот факт, что новые фрагменты отстающей цепи ДНК закладываются у эукариот с интервалами в 10 раз более короткими (от 100 до 200 нуклеотидов), чем у бактерий (от 1000 до 2000 нуклеотидов). Кроме того, если нуклеотиды служат барьерами, на время останавливающими продвижение ДНК-полимеразы, присутствие хроматина (а не голой ДНК) может, вероятно, объяснить и то, что репликационные вилки движутся у эукариот приблизительно в 10 раз медленнее, чем у бактерий.

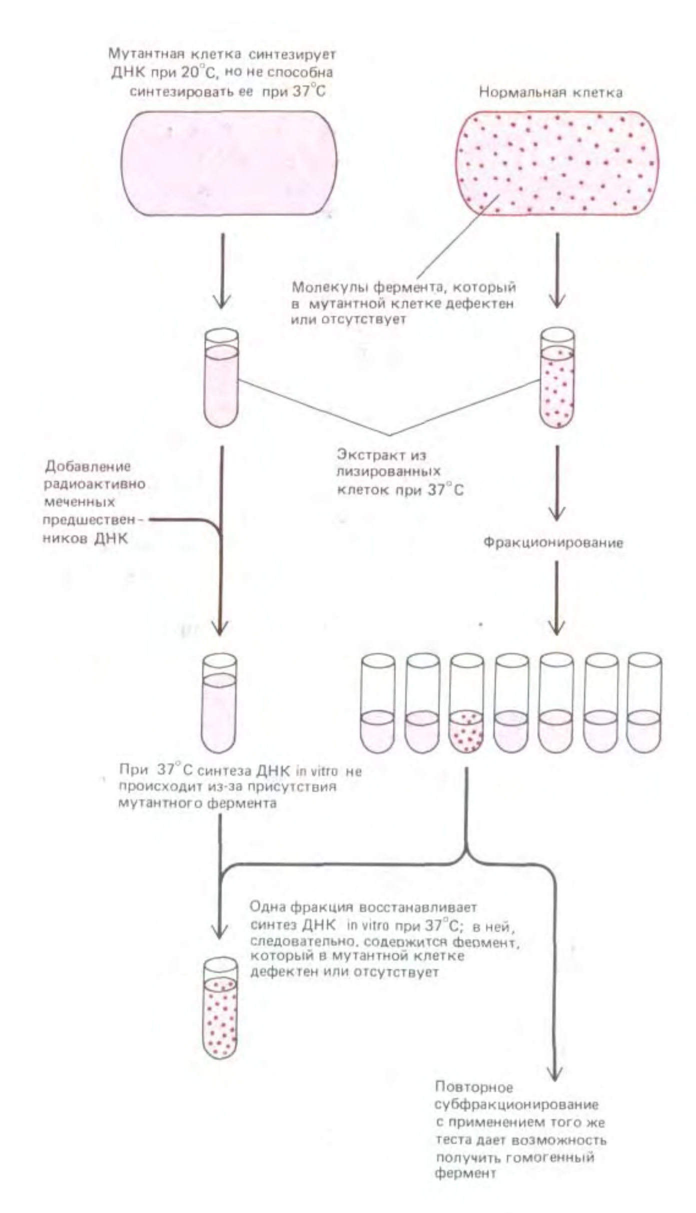


Рис. 5-54. Получение у бактерий и бактериофагов мутантов с различными нарушениями репликации ДНК открыло возможности для выявления и очистки ферментов, выполняющих какую-либо еще не известную функцию, необходимую для репликации ДНК у прокариот. Использованные здесь температурочувствительные мутанты принадлежат к так называемым условным мутантам, обычно их фермент нормально функционирует при низкой температуре и не работает при высокой. У «безусловных» мутантов с нарушениями репликации синтез ДНК не идет ни при низкой, ни при высокой температуре, и потому эти мутанты обречены на гибель. В модифицированной форме такие «тесты на комплементацию in vitro» полезны также при биохимическом изучении многих других процессов.

Заключение

Самокорректирующая ДНК-полимераза катализирует полимеризацию нуклеотидов на обеих цепях спирали ДНК в направлении 5′ → 3′, копируя матрицу с высокой степенью точности. Поскольку две цепи двойной спирали ДНК антипараллельны, в направлении 5′ → 3′ может непрерывно синтезироваться лишь одна из двух цепей (ее называют ведущей). Другая, отстающая цепь синтезируется в виде коротких фрагментов по принципу «шитья назад иголкой». Самокорректирующая ДНК-полимераза не способна начинать синтез новой цепи. Поэтому для закладки фрагментов отстающей цепи ДНК используются короткие молекулы РНК-затравки, которые позже удаляются - их заменяет ДНК.

Процесс репликации ДНК требует совместного действия многих белков. В нем участвуют: 1) ДНК-полимераза и ДНК-праймаза, катали-

зирующие полимеризацию нуклеозидтрифосфатов; 2) ДНК-геликазы и дестабилизирующие белки, помогающие расплести спираль ДНК, которую предстоит копировать; 3) ДНК-лигаза и фермент, разрушающий молекулы РНК-затравки; они нужны для сшивания прерывисто синтезируемых фрагментов отстающей цепи ДНК; 4) ДНК-топоизомеразы, помогающие решить проблемы кручения и спутывания спирали ДНК; 5) инициаторные белки, присоединившиеся к специфическим последовательностям ДНК в точке начала репликации и способствующие образованию здесь новой репликационной вилки. В точке начала репликации к ДНК-матрице сначала присоединяется белковый комплекс, состоящий из ДНК-геликазы и ДНК-праймазы (его называют праймосомой); затем к этому комплексу добавляются другие белки и возникает мультиферментный комплекс —«репликационная машина», которая и осуществляет синтез ДНК.

5.4. Механизмы генетической рекомбинации [35]

В двух предыдущих разделах этой главы мы рассмотрели механизмы, благодаря которым нуклеотидные последовательности ДНК передаются в ряду клеточных поколений почти неизменными. Генетическая стабильность крайне важна для выживания, когда речь идет о сравнительно коротких сроках, но для длительного существования вида необходима генетическая изменчивость, которая позволяла бы приспосабливаться к изменяющейся среде. Следовательно, важным свойством ДНК следует считать ее способность к перестройкам, которые могут изменять и комбинацию генов в данном геноме, и их экспрессию (ее время и степень). Перестройки в ДНК представляют собой результат **генетической рекомбинации.** События, из которых слагается генетическая рекомбинация, могут быть подразделены на два больших класса: общая рекомбинация и сайт-специфическая рекомбинация. В процессе *общей рекомбинации* генетический обмен происходит между гомологичными нуклеотидными последовательностями ДНК, по большей части между двумя копиями одной и той же хромосомы. Одним из самых известных примеров такого рода служит обмен участками гомологичных хромосом (гомологов) в процессе *мейоза.* Этот обмен *(кроссинговер),* происходящий между плотно конъюгированными хромосомами на ранних стадиях развития яйца или сперматозоида (см. разд. 15.2.3), создает возможность для опробования разных вариантов *(аллелей)* одного и того же гена в новых комбинациях с другими генами и тем самым повышает шансы на выживание в изменяющейся среде (по крайней мере для некоторых членов скрещивающейся популяции (см. разд. 15.2.2). Мейоз свойствен только эукариотам, но преимущества подобного комбинирования генов настолько велики, что и у прокариотических организмов развились в ходе эволюции такие процессы, как скрещивание и перегруппировка генов путем общей генетической рекомбинации. *Сайт-специфическая рекомбинация* отличается от общей рекомбинации тем, что для ее осуществления не требуется гомологии ДНК. В обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной и той же или обеих спиралей ДНК, участвующих в этом процессе, распознаваемые особым сайт-специфическим рекомбинационным ферментом. Таким образом, сайт-специфическая рекомбинация изменяет распределение нуклеотидных последовательностей в геноме. Иногда эти изменения приурочены к каким-то этапам и определенным образом организованы, как, например, при исключении интегрированного бактериофага из бактериальной хромосомы. Однако они могут носить и совершенно случайный характер, например при включении в геном подвижных (мобильных) элементов.

Что касается биохимии генетической рекомбинации, то как и в случае репликации ДНК, большую часть того, что мы знаем об этих процесса, удалось выяснить в исследованиях на простых организмах, в частности на *E. coli* и ее вирусах.

5-31

5.4.1. Процессы общей рекомбинации направляются взаимодействиями, обусловленными спариванием основа™ между комплементарными цепями гомологичных спиралей ДНК [36]

Общая рекомбинация включает ряд промежуточных этапов, для понимания которых необходимо затратить определенные усилия. Кроме того механизм обмена между цепями ДНК, по-видимому, несколько различается у разных организмов. Однако детальный генетический анализ скрещивания у бактерий, вирусов и грибов дает основания считать, что в целом результаты общей рекомбинации всегда одинаковы:

1. Две гомологичные двойные спирали ДНК разрываются и разорванные концы одного гомолога соединяются с соответствующими концами другого, так что вновь получаются две целые спирали ДНК но теперь уже каждая из них состоит из частей двух исходных молекул ДНК (рис. 5-55).

2. Точка обмена (т.е. то место, где на рис. 5-55 красная спираль соединяется с черной) может прийтись на любой участок гомологичных нуклеотидных последовательностей хромосом.

3. В точке обмена каждая полинуклеотидная цепь одной из спиралей соединяется путем спаривания оснований с цепью другой спирали, и между двумя разными спиралями ДНК возникает ступенчатое (гетеродуплексное) соединение (рис. 5-56). Такие соединения могут состоять из нескольких тысяч пар оснований. Как именно они возникают, мы объясним позже.

4. В точке обмена не происходит изменения нуклеотидных последовательностей. Точность разрыва и воссоединения настолько велика, что ни один нуклеотид не утрачивается, не добавляется и не превращается в какой-нибудь другой.

Механизм общей рекомбинации таков, что в обмен могут вступать только два участка спирали ДНК, нуклеотидные последовательности которых обладают высокой степенью гомологии. Обеспечивается это наличием гетеродуплексного соединения в точке обмена, поскольку такое соединение может образоваться лишь в том случае, если комплементарные взаимодействия между цепями, принадлежавшими двум исходным спиралям, происходят на достаточно длинном участке. Но как именно возникает это ступенчатое соединение и как две гомологичные спирали ДНК, которые должны спариться, распознают гомологию своих нуклеотидных последовательностей? Как мы увидим, гомологичные участки сначала узнают друг друга непосредственно путем комплементарного спаривания. В дальнейшем образование пар оснований между комплементарными цепями, принадлежащими двум спиралям ДНК, направляет общую рекомбинацию таким образом, что она происходит лишь в пределах достаточно протяженной области гомологии двух нуклеотидных последовательностей ДНК. Однако и при соблюдении этого условия общая рекомбинация нередко ведет к перераспределению нуклеотидных последовательностей ДНК; гетеродуплексное соединение может заключать в себе небольшое число неправильных пар оснований и, что еще более важно, две спирали ДНК, претерпевающие кроссинговер, бывают обычно не вполне одинаковыми по обе стороны от этого соединения.

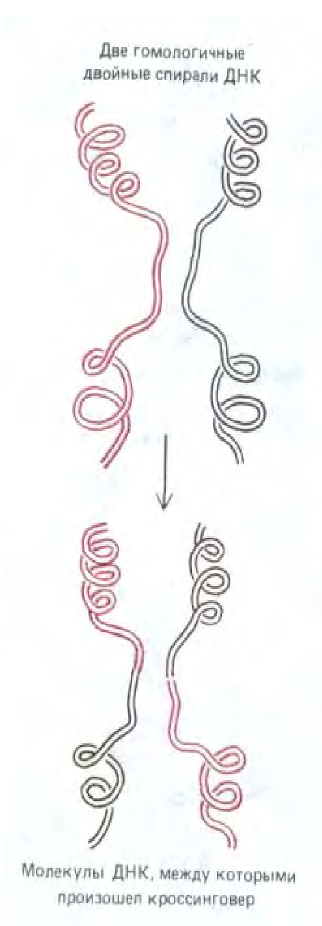


Рис. 5-55. Разрыв и воссоединение двух гомологичных двойных спиралей ДНК в процессе общей рекомбинации. В результате образуются две кроссоверные хромосомы.

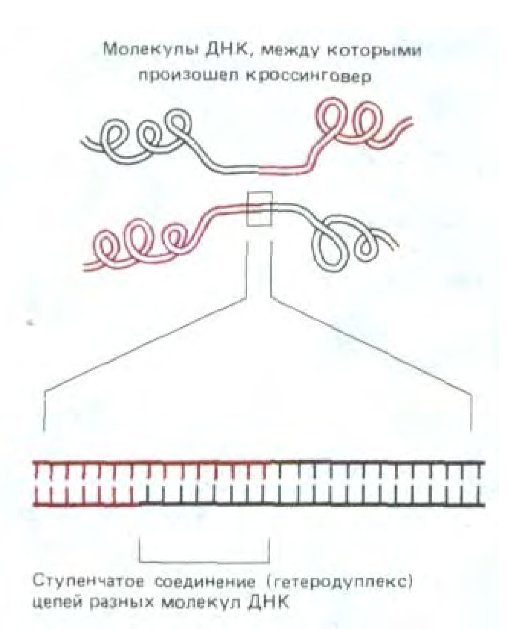


Рис. 5-56. Ступенчатое соединение, связывающее две хромосомы в том месте, где между ними произошел кроссинговер. Длина таких соединений часто достигает нескольких тысяч нуклеотидов.

5-32

5.4.2. Общая рекомбинация инициируется в точке разрыва одной из двух цепей двойной спирали ДНК [36]

Каждая из двух цепей молекулы ДНК закручена вокруг другой цепи. Вследствие этого любые комплементарные взаимодействия между двумя гомологичными двойными спиралями ДНК возможны лишь в том случае, если сначала в какой-либо одной из двух цепей возникнет разрыв, который освободит эту цепь для необходимого раскручивания и повторного закручивания. По той же причине для любого взаимного обмена цепями между двумя двойными спиралями ДНК нужно не меньше двух разрывов, т. е. по одному одноцепочечному разрыву в каждой из двух двойных спиралей. Ясно, наконец, что для образования ступенчатого (гетеродуплексного) соединения, изображенного на рис. 5-56, должны разорваться все четыре цепи, потому что лишь в этом случае каждая из них может воссоединиться с другим партнером. При общей рекомбинации все эти разрывы и воссоединения осуществляются и координируются таким образом, что они могут происходить лишь тогда, когда в двух спиралях ДНК имеются достаточно протяженные участки с гомологичными нуклеотидными последовательностями.

В экспериментах со многими различными организмами выяснилось, что для инициации событий, из которых слагается общая рекомбинация,

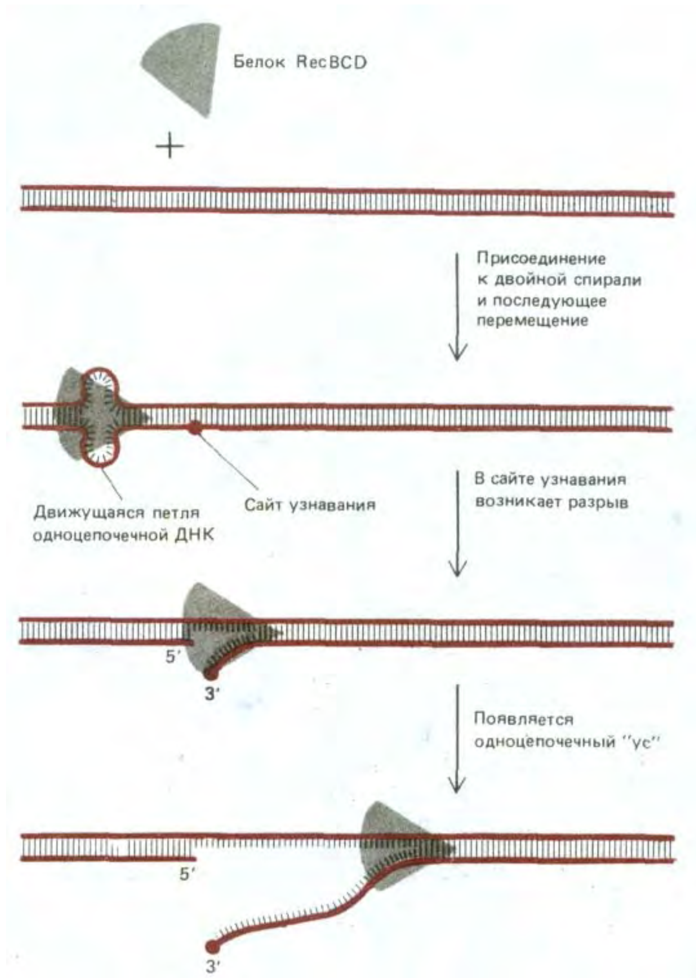


Рис. 5-57. Реакция, катализируемая белком recBCD - ферментом, участвующим в общей рекомбинации у *E. coli.* Белок присоединяется к двойной спирали ДНК с одного конца и движется к другому ее концу со скоростью около 300 нуклеотидов в секунду, используя для своего движения энергию, высвобождающуюся при гидролизе связанного АТР. Одновременно с белком движется возникшая под его воздействием петля ДНК. Когда она достигает на спирали особой восьминуклеотидной последовательности, называемой сайтом узнавания (recognition site; такие последовательности имеются в разных участках хромосомы *E. coli*), одна из цепей разрывается, высвобождая небольшой одноцепочечный «ус». Этот «ус» может инициировать генетическую рекомбинацию путем спаривания с гомологичной спиралью (см. рис. 5-58).

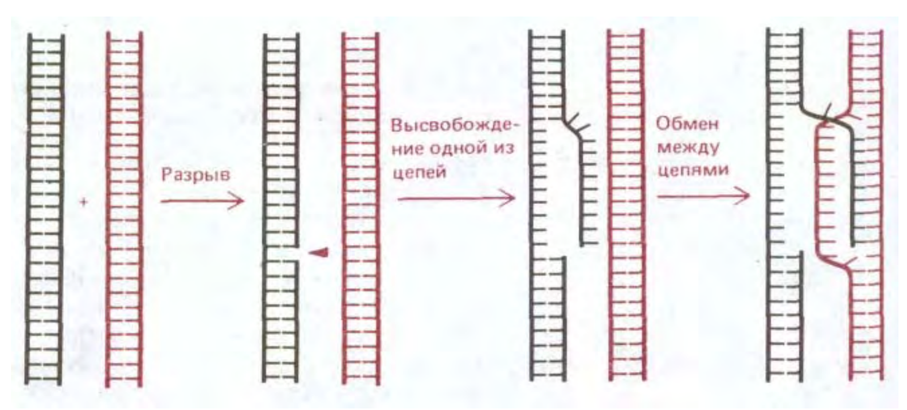


Рис. 5-58. Схема, иллюстрирующая начальный одноцепочечный обмен между двумя гомологичными двойными спиралями ДНК в процессе общей рекомбинации. Разрыв в одной из цепей ДНК высвобождает эту цепь и она внедряется во вторую спираль, образуя здесь короткий спаренный участок. Спариваться таким путем и тем самым инициировать общую рекомбинацию могут только такие две молекулы ДНК, у которых нуклеотидные последовательности комплементарны. Известны ферменты, катализирующие все представленные здесь этапы (см. рис. 5-57 и 5-60).

достаточно одного разрыва только в одной из двух цепей ДНК. Оказалось, что факторы, вызывающие появление таких одноцепочечных разрывов, например химические агенты или некоторые виды излучения, могут инициировать генетическую рекомбинацию. Более того, удалось показать, что один из специфических белков, необходимых для рекомбинации у *E.* coli, а именно *белок recBCD,* вызывает в молекулах ДНК одноцепочечные разрывы. Белок recBCD представляет собой ДНК-зависимую АТРазу, которая действует как ДНК-геликаза - перемещается по спирали ДНК и расплетает ее, делая ее цепи доступными. Под влиянием белка recBCD, сочетающего нуклеазную и геликазную активность, на двойной спирали ДНК возникает одноцепочечный участок - «ус» (whisker) (рис. 5-57). Рис. 5-58 дает представление о том, как наличие такого одноцепочечного участка может индуцировать начальное взаимодействие между двумя комплементарными участками двойной спирали ДНК.

5-33

5.4.3. Гибридизация ДНК может служить моделью этапа общей рекомбинации, связанного с комплементарным спариванием [29, 37]

В простейшей форме комплементарные взаимодействия, играющие в общей рекомбинации центральную роль, можно воспроизвести в экспериментах in vitro по ренатурации ДНК, разделенной на отдельные цепи. Такая **ренатурация** (или **гибридизация)** происходит, когда в растворе вследствие случайного соударения одиночных цепей ДНК комплементарные нуклеотидные последовательности оказываются одна напротив другой и образуют короткий отрезок двойной спирали. За этим сравнительно медленным этапом *нуклеации* спирали следует очень быстрый этап *«застегивания молнии»:* двойная спираль при этом растет до тех пор, пока не образуется максимально возможное число водородных связей (рис. 5-59). Для образования таким путем новой двойной спирали разделившиеся цепи во время отжига должны быть выпрямлены, чтобы их основания были открытыми. По этой причине эксперименты с гибридизацией ДНК in vitro проводят при высокой температуре или в присутствии таких органических растворителей, как формамид; в этих условиях «плавятся» и короткие спирали («шпильки»), возникающие в одиночной цепи ДНК вследствие комплементарных взаимодействий при ее складывании саму на себя. Бактериальные клетки не переносят, разумеется, столь жестких воздействий. В них распрямление спиралей достигается под воздействием специального дестабилизирующего белка, или SSB-белка. У *E. coli* SSB-белок необходим и для репликации ДНК, и для общей рекомбинации; кооперативно связываясь с сахарофосфат-

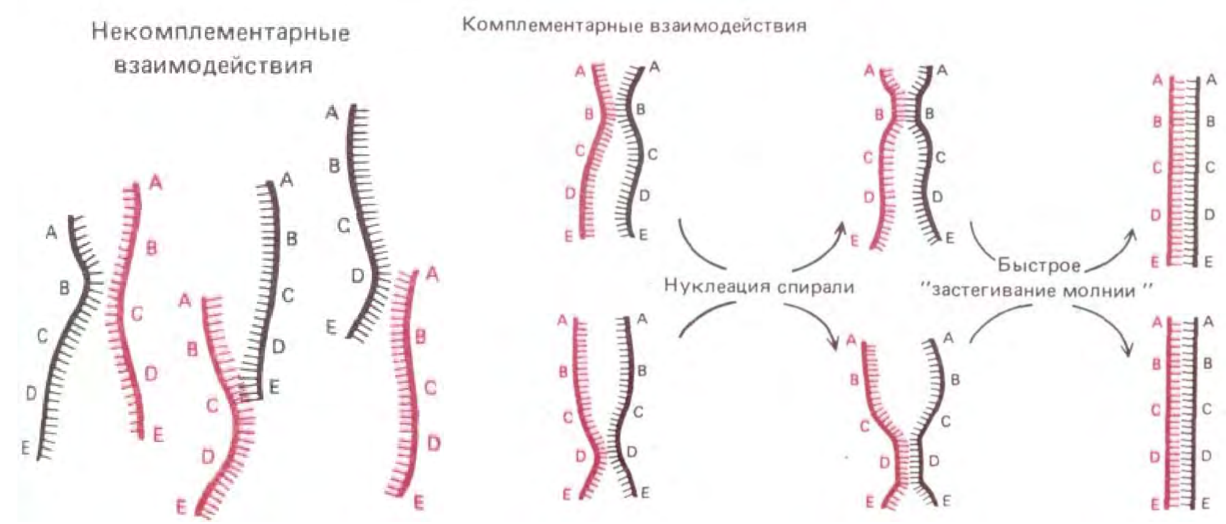


Рис. 5-59. При гибридизации ДНК in vitro двойные спирали ДНК образуются заново из ранее разделившихся цепей. Восстановление спиралей зависит от случайного соударения двух комплементарных целей. Большинство таких соударений безрезультатно (как это видно из левой части рисунка), но некоторые из них приводят к спариванию на коротком участке комплементарных оснований (т. е. к нуклеации спирали). За этим следует быстрое «застегивание молнии» и двойная спираль готова. Посредством такого процесса - методом проб и ошибок каждая цепь ДНК может найти себе комплементарного партнера среди миллионов «неподходящих» цепей. По-видимому, общая рекомбинация всегда инициируется именно таким путем: комплементарные партнеры узнают друг друга методом проб и ошибок.

ным остовом всех одноцепочечных участков ДНК, он поддерживает их в растянутой конформации и делает основания доступными. В такой конформации одноцепочечная ДНК способна присоединять путем спаривания оснований либо молекулы нуклеозидтрифосфатов (при репликации ДНК), либо комплементарные участки другой одноцепочечной ДНК (при генетической рекомбинации). Если гибридизацию ДНК проводят in vitro в условиях, напоминающих внутриклеточные, то белок SSB ускоряет нуклеацию спирали ДНК, а значит, и весь процесс отжига более чем в 1000 раз.

5-34

5.4.4. Белок recA у E. coli дает возможность одиночным цепям ДНК спариваться с гомологичным участком двойной спирали ДНК [38]

Общая генетическая рекомбинация - более сложный процесс, нежели описанная выше простая гибридизация ДНК. При общей рекомбинации в двойную спираль ДНК должна внедриться одиночная цепь ДНК, высвободившаяся из другой двойной спирали (см. рис. 5-58). У *E. coli* для этого необходим белок recA. Этот белок представляет собой продукт гена r*ecA,* который, как выяснилось в 1965 г., играет главную роль в конъюгации хромосом. Биохимики долго вели поиски важного, но неуловимого продукта этого гена, и наконец, в 1976 г. его удалось получить в чистом виде. Он оказался белком с молекулярной массой 38000 дальтон. Подобно дестабилизирующему белку, он прочно связывается в виде крупных кооперативно образованных кластеров с одиночными цепями ДНК, однако есть у recA-белка и некоторые особые свойства. В частности, у него имеются два участка (сайта) для связывания ДНК, благодаря чему он способен удерживать вместе одиночную цепь и двойную спираль. Эти два участка для связывания ДНК позволяют белку recA катализировать образование синапсиса - между двойной спиралью ДНК и гомологичным участком одноцепочечной ДНК, как это показано на рис. 5-60. Ключевым этапом в этой реакции является определение области гомологии путем начального спаривания между комплементарными нуклеотидными последовательностями (2-й этап на рис. 5-60). Это взаимодействие кладет начало процессу спаривания (см. рис. 5-58) и тем самым инициирует обмен одноцепочечными участками между двумя двойными спиралями ДНК, претерпевающими

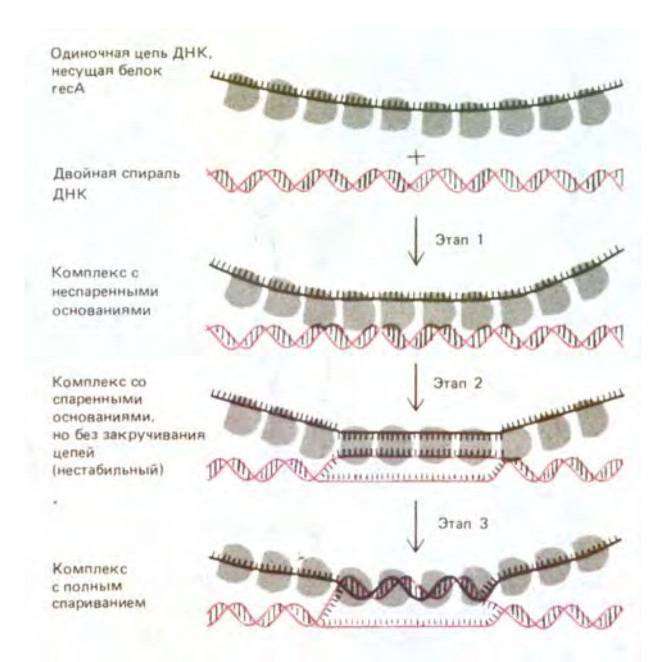


Рис. 5-60. Эксперименты in vitro показывают, что между одноцепочечной ДНК, несущей белок recA, и двойной спиралью может образоваться несколько различных комплексов. Сначала (1-й этап) возникает комплекс с неспаренными основаниями. Далее он, как только будет найден участок с гомологичной нуклеотидной последовательностью (2-й этап), превращается в комплекс со спаренными основаниями, в котором, однако, цепи на закручены. Такой комплекс нестабилен, потому что ДНК находится в нем в необычной форме: две ее цепи либо вообще не закручены в спираль, либо закручены так, что в ней чередуются участки правой (т.е. нормальной) и левой спиралей. На 3-м этапе обмен цепями стабилизируется. Для этого в одной из двух цепей, образующих спираль, должен возникнуть разрыв (здесь не показан), а затем одна цепь должна быть закручена в спираль вокруг другой.

рекомбинацию. В экспериментах in vitro было показано, что дестабилизирующий белок *E. coli* (белок SSB) и белок recA действуют кооперативно, облегчая реакции спаривания. Быть может, именно по этой причине генетическая рекомбинация в клетках *E. coli* резко ослабевает, если хоть один из этих белков оказывается дефектным.

После того как образование синапсиса произошло, короткий участок гетеродуплекса, в котором начали спариваться цепи, принадлежащие двум разным молекулам ДНК, увеличивается за счет направляемой белком миграции ветви, которая также катализируется белком recA. **Миграция ветви** может происходить в любой точке там, где две одинаковые по своей последовательности одиночные цепи ДНК пытаются спариться с одной и той же комплементарной цепью; неспаренный участок одной цепи вытесняет спаренный участок другой, смещая таким образом точку ветвления, хотя само число спаренных оснований при этом не изменяется. Спонтанно миграция ветви идет с равной вероятностью в обоих направлениях и потому трудно ожидать, чтобы она

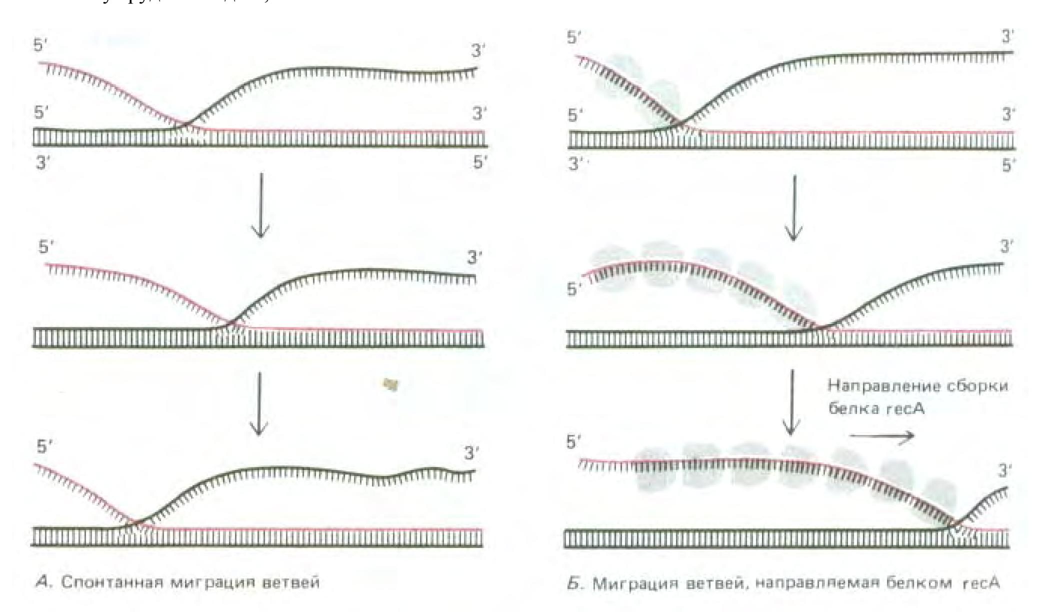


Рис. 5-61. Два типа миграции ветвей, наблюдаемые в экспериментах in vitro. Спонтанно миграция идет в обоих направлениях, подчиняясь закону случая, поэтому реальное перемещение при этом очень невелико. Миграция же с участием белка recA идет с постоянной скоростью только в одном направлении, энергию для нее, очевидно, поставляет процесс поляризованной сборки белка recA на одиночной цепи ДНК, идущий в указанном направлении.

могла привести к эффективному завершению процесса рекомбинации (рис. 5-61, *А)*. В присутствии белка recA эта миграция приобретает направленный характер, так что гетеродуплексный участок быстро увеличивается, достигая нескольких тысяч спаренных нуклеотидов (рис. 6-61, Б).

Катализ процесса миграции ветви связан и с другой особенностью белка recA. Помимо наличия двух ДНК-связывающих сайтов этот белок (подобно белку recBCD) имеет и еще один дополнительный участок - для связывания и гидролиза АТР, т.е. он представляет собой ДНК-зависимую АТРазу. Он связывается с ДНК намного прочнее, когда к нему присоединен не ADP, а АТР. Более того, новые несущие молекулы recA предпочтительно связываются с одним из концов белковой нити, и АТР гидролизуется при этом до ADP. Можно видеть, таким образом, что нити белка recA, выстраивающиеся на ДНК, в смысле динамики сборки имеют много общего с нитями тубулина или актина, образующими цитоскелет; об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что направленное продвижение белка recA вдоль цепи ДНК способно служить движущей силой для реакции миграции ветви, как это показано на рис. 5-61, *Б.*

5-35

5.4.5. Общая генетическая рекомбинация включает обычно обмен с перекрещиванием цепей [39]

Трудным и медленным этапом общей генетической рекомбинации является одноцепочечный обмен между двумя двойными спиралями (см. рис. 5-58). После этого начального обмена гомологичные нуклеотидные последовательности двух взаимодействующих спиралей устанавливаются в строгом соответствии одна с другой, и потому расширение области спаривания и «закладка» новых обменов между двумя спиралями происходят быстро. Во время этих событий часто наблюдаются удаление некоторого количества нуклеотидов и локальный ресинтез ДНК, сходные с теми, какие имеют место при репарации ДНК. Однако возможных вариантов здесь много, так что разные организмы нередко используют на этой стадии различающиеся в деталях механизмы. Большая часть механизмов включает в качестве промежуточного этапа **обмен с перекрещиванием цепей** между двумя спиралями ДНК. Один из самых простых путей образования соответствующей структуры показан на рис. 5-62.

В структуре с перекрещивающимися цепями (ее называют также *структурой Холлидея)* две гомологичные спирали ДНК после первоначального этапа спаривания удерживаются вместе благодаря перекрестному обмену двумя цепями из имеющихся четырех - по одной цепи от каждой спирали. Для поддержания этой структуры не требуется, чтобы нарушалось спаривание оснований. Структура обладает некоторыми интересными и важными свойствами. 1. Точка обмена между двумя гомологичными спиралями ДНК, расположенная там, где скрещиваются две их цепи (рис. 5-62), может быстро перемещаться по спирали взад и вперед (миграция двух ветвей). 2. Структура, образующаяся при обмене с перекрещиванием цепей, содержит две перекрещенные и две неперекрещенные цепи. Эта структура может существовать в различных изомерных формах, возникающих в результате вращения составляющих ее элементов относительно друг друга, как показано на рис. 5-63. Изомеризация меняет положение двух пар цепей: две ранее перекрещивавшиеся цепи становятся неперекрещивающимися, и наоборот.

Для того чтобы вновь восстановились две отдельные спирали ДНК

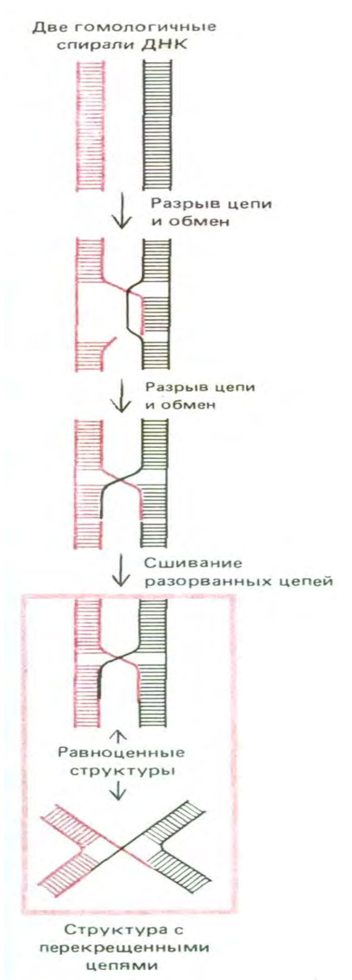


Рис. 5-62. Обмен с перекрещиванием цепей. Много возможных путей ведет от структуры, представленной на рис. 5-58 (одноцепочечный обмен), к структуре с перекрещенными цепями. Здесь показан один из таких путей. Более точное представление о структуре с перекрещенными цепями дает, вероятно, верхнее из - приведенных здесь изображений, однако нижнее позволяет лучше понять реакцию изомеризации, которую иллюстрирует рис. 5-63.

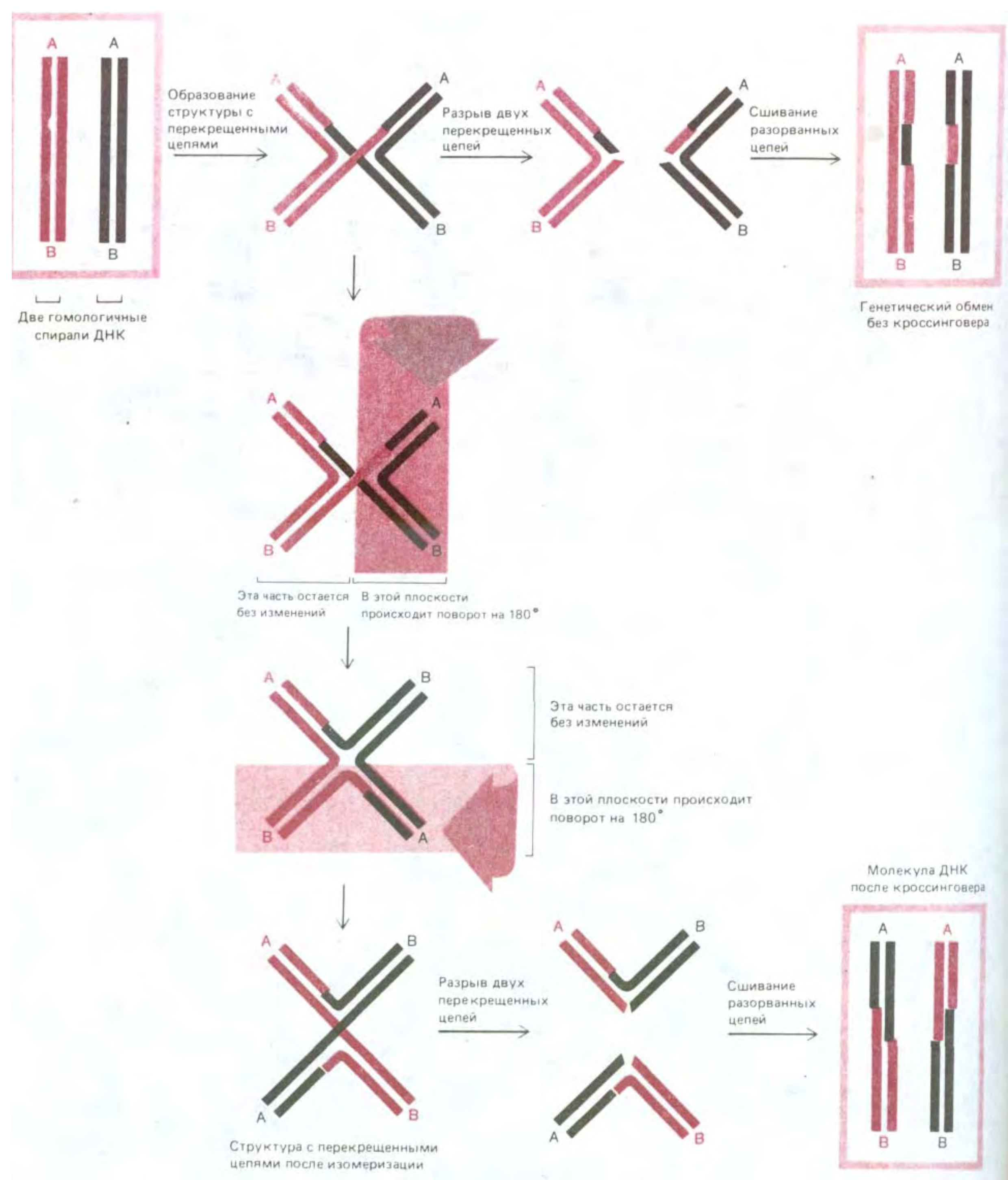


Рис. 5-63. Изомеризация структуры с перекрещенными цепями. При отсутствии изомеризации разрыв двух перекрещенных цепей приводит к тому, что обмен завершается без кроссинговера *(вверху)*. В случае изомеризации разрыв перекрещенных цепей дает две кроссоверные хромосомы *(внизу)*. Полагают поэтому, что изомеризация требуется для разрыва и воссоединения двух гомологичных двойных спиралей ДНК при общей генетической рекомбинации.

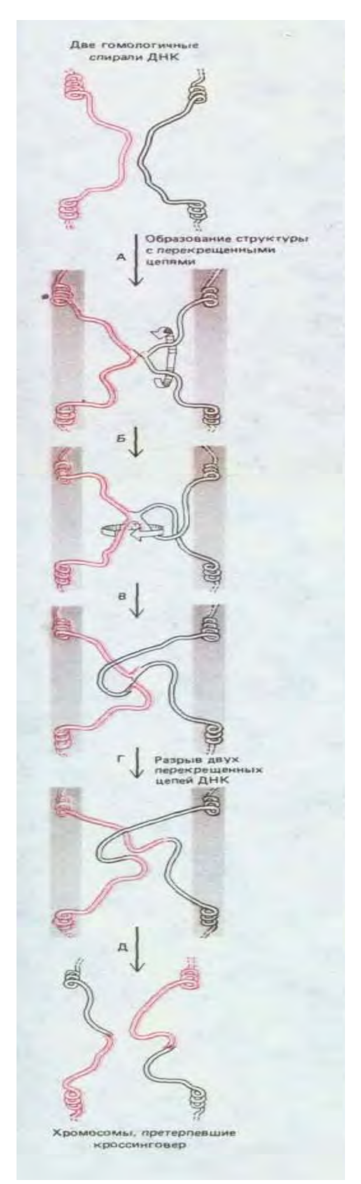


Рис. 5-64. Общая генетическая рекомбинация между двумя гомологичными хромосомами, приводящая к кроссинговеру. Изомеризация структуры с перекрещенными цепями происходит так, как это представлено на рис. 5-63.

и тем самым прекратился процесс спаривания, в каждой из двух перекрещенных цепей должен произойти разрыв. Если он произойдет до того, как структура с перекрещенными цепями подвергнется изомеризации, то две исходные спирали ДНК отделятся друг от друга почти неизменными - у каждой из них будет изменена только одна из цепей и только на коротком отрезке (рис. 5-63, *вверху).* Если же разрыв двух перекрещенных цепей произойдет после изомеризации, то часть каждой исходной спирали ДНК окажется присоединенной (ступенчатым соединением) к части другой спирали; иными словами, между двумя спиралями произойдет кроссинговер (рис. 5-63, *внизу).*

Изомеризация, как предполагают, необходима для того, чтобы между двумя хромосомами мог произойти кроссинговер. Рис. 5-64 показывает, как мог бы протекать этот процесс между двумя сестринскими хроматидами в митотических клетках или между несестринскими хроматидами во время мейоза. Хотя изомеризация должна происходить спонтанно с определенной частотой, в клетках она, возможно, ускоряется или регулируется каким-либо иным путем. Какая-то регуляция осуществляется, по всей вероятности, во время мейоза, когда две спаривающиеся двойные спирали ДНК оказываются прижатыми одна к другой в синаптонемальном комплексе.

5.4.6. Общая генетическая рекомбинация в сочетании с ограниченным синтезом ДНК ведет к конверсии генов [40]

Один из фундаментальных законов генетики гласит, что оба родителя вносят равный вклад в генетическую конституцию потомства, поскольку один полный набор генов потомок получает от матери, а другой - от отца. Таким образом, когда из одной диплоидной клетки путем мейоза образуются четыре гаплоидные (разд. 15.2.1), в каждой из этих клеток ровно половину всех генов должны составлять материнские гены, а другую половину - отцовские. Проверить справедливость этого утверждения для сложного организма, в частности организма человека, разумеется, невозможно. К счастью, существуют и такие организмы, например грибы, у которых можно выделить и подвергнуть анализу все четыре дочерние клетки, образовавшиеся в результате мейоза из одной-единственной клетки. Подобный анализ показал, что из строгих генетических правил есть исключения. Иногда мейоз дает три копии материнского варианта (аллеля) данного гена и лишь одну копию отцовского аллеля, что свидетельствует о превращении одной из двух копий отцовского аллеля в копию материнского аллеля. Этот феномен получил название **конверсии генов.** Часто конверсия генов бывает связана с общей генетической рекомбинацией, и возможно, это явление играет немаловажную роль в эволюции некоторых генов (см. разд. 10.5.2). Полагают, что конверсия генов представляет собой прямое следствие действия двух механизмов - общей генетической рекомбинации и репарации ДНК.

При мейозе в точках кроссинговера между гомологичными материнскими и отцовскими хромосомами возникают гетеродуплексные соединения. Если нуклеотидные последовательности материнской и отцовской ДНК слегка различаются, то образуется несколько неправильных пар. Появившееся в результате этого нарушение двойной спирали ДНК

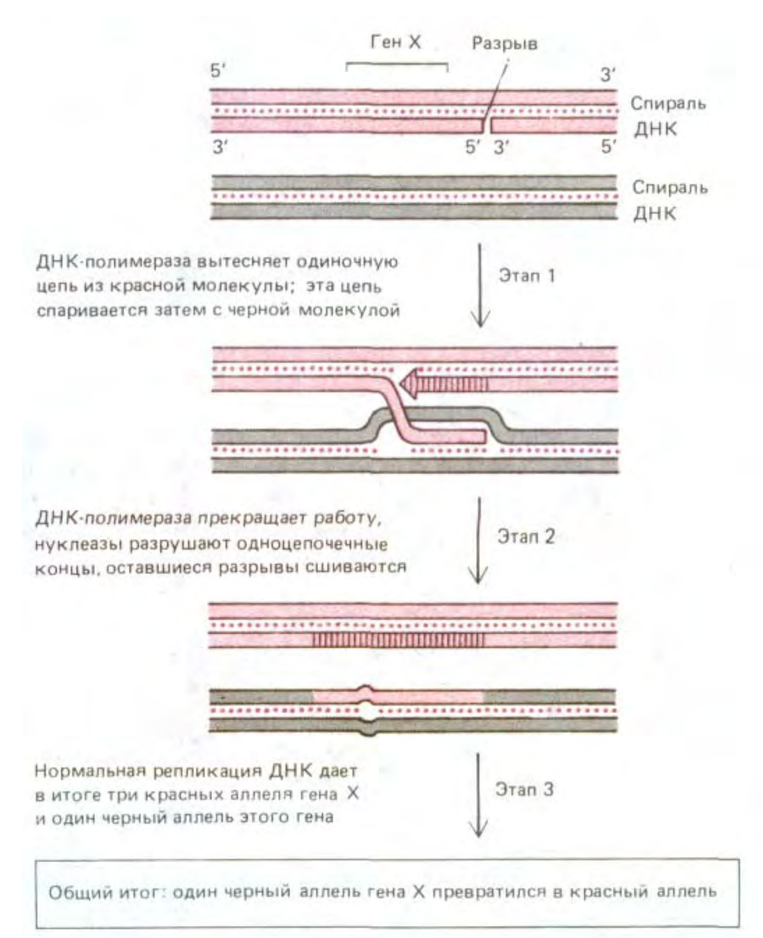


Рис. 5-65. Гипотетический механизм общей рекомбинации, приводящий к конверсии генов. На 1-м этапе ДНК-полимераза начинает синтез дополнительной копии одной из цепей красной спирали, вытесняя прежнюю копию из спирали в виде одиночной цепи. Эта одиночная цепь спаривается с гомологичным участком черной спирали способом, который иллюстрирует рис. 5-60. На 2-м этапе короткий неспаренный участок черной цепи подвергается разрушению, чем и завершается перенос нуклеотидной последовательности из одной спирали в другую. Общий результат произошедших изменений выявляется обычно в следующем клеточном цикле, после того как репликация ДНК приведет к разделению двух «неподходящих» цепей (3-й этап).

может быть исправлено репаративным аппаратом (см. разд. 5.2.7): он либо удаляет какие-то нуклеотиды из отцовской цепи и заменяет их нуклеотидами, комплементарными материнской цепи, либо выполняет противоположную операцию - репарирует материнскую цепь. Результатом этой репарации неправильного спаривания оказывается конверсия генов. Существуют и некоторые другие механизмы, способные осуществлять конверсию генов, но во всех случаях для этого требуется некое событие, имеющее отношение к общей генетической рекомбинации, которое сведет вместе две копии ДНК с очень близкой нуклеотидной последовательностью. Поскольку при этом образуется лишняя копия одной из двух последовательностей, должен иметь место также и синтез некоторого количества ДНК. Генетический анализ показывает, что конверсия генов происходит обычно лишь на небольшом отрезке ДНК, а во многих случаях изменяется вообще только часть одного какого-нибудь гена.

При митозе также может происходить конверсия генов, хотя и несколько реже. Вероятно, как и в процессе мейоза, она возникает здесь вследствие репарации гетеродуплексов ДНК, содержащих неправильные пары. Рис. 5-65 иллюстрирует еще один гипотетический механизм конверсии генов, пригодный и для мейоза, и для митоза.

5-36

5.4.7. Ферменты сайт-специфической рекомбинации вводят в геном особые нуклеотидные последовательности ДНК и выводят их из геномов [41]

Сайт-специфическая рекомбинация отличается от общей тем, что в этом случае особый рекомбинационный фермент узнает специфические нукле-

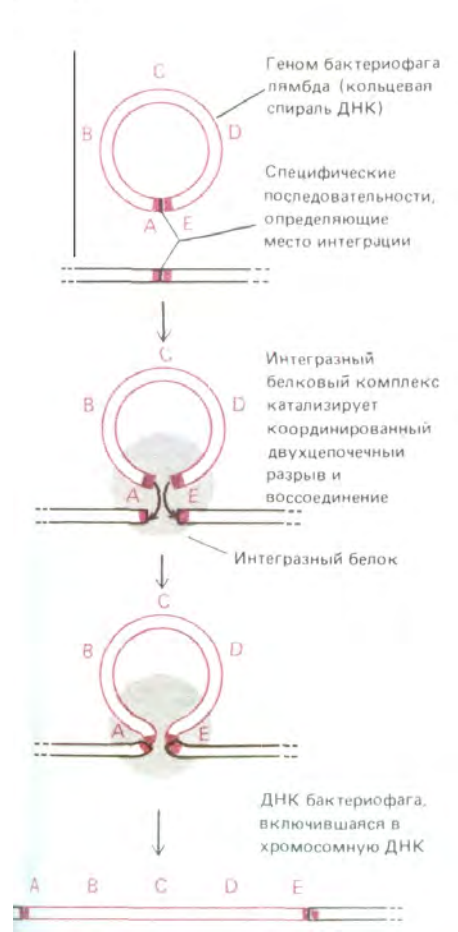


Рис. 5-66. Сайт-специфическая рекомбинация, посредством которой ДНК бактериофага λ внедряется в хромосому клетки-хозяина *(E. coli).* Особые участки (сайты), которые узнает интеграза *(серый круг),* представляют собой определенные нуклеотидные последовательности ДНК. Здесь их символизируют красные прямоугольники (см. также рис. 5-74 и 9-19).

отидные последовательности в одной или в двух рекомбинирующих молекулах ДНК. Спаривания оснований здесь не требуется (даже в тех системах, где оно все-таки происходит, в образовании гетеродуплекса участвует не более нескольких пар оснований). Эта форма рекомбинации дает возможность различным типам мобильных последовательностей ДНК перемещаться в пределах хромосом или переходить из одной хромосомы в другую.

Сайт-специфическая рекомбинация впервые была описана для *бактериофага лямбда.* Именно с ее помощью происходит включение этого фага в хромосому *E. coli* и его исключение из нее. В интегрированном состоянии бактериофаг лямбда реплицируется как составная часть ДНК клетки-хозяина (см. разд. 5.5.6). Когда фаговая частица проникает в клетку, в этой клетке синтезируется фермент *лямбда-интеграза,* кодируемый одним из фаговых генов. Этот фермент катализирует процесс рекомбинации, начинающийся с того, что многие копии интегразного белка прочно связываются с особыми нуклеотидными последовательностями на кольцевой хромосоме бактериофага. Возникший таким путем ДНК-белковый комплекс присоединяется теперь к другой специфической последовательности ДНК, на этот раз на хромосоме бактерии, тесно сближая таким образом хромосомы бактерии и бактериофага (рис. 5-66). Сведя их вместе, интеграза катализирует необходимые реакции разрыва и сшивания ДНК; при этом короткий участок, на котором нуклеотидные последовательности гомологичны, используется для образования в точке соприкосновения небольшого ступенчатого соединения (рис. 5-67, А). Интеграза обладает ДНК-топоизомеразной активностью, однако отдельные этапы рекомбинации следуют друг за другом столь быстро, что уловить какие-либо промежуточные формы ДНК, которые, по-видимому, все же образуются, не представляется возможным.

Механизм сайт-специфической рекомбинации обеспечивает и исключение фага из бактериальной хромосомы, после чего начинается его быстрое размножение в бактериальной клетке. Реакция исключения катализируется комплексом, в состав которого входит помимо интегразы еще один белок бактериофага, который этот вирус начинает продуцировать лишь в том случае, если клетка-хозяин подвергается стрессу (см. рис. 9-20).

Многие другие ферменты, катализирующие сайт-специфическую рекомбинацию, сходны с лямбда-интегразой в том отношении, что им также необходим короткий участок гомологии в двух отрезках ДНК, подлежащих соединению. Данное требование предполагает довольно высокую избирательность каждого из этих ферментов в отношении рекомбинируемых последовательностей ДНК.

В другом классе ферментов, осуществляющих сайт-специфическую рекомбинацию, эта избирательность выражена не столь сильно. Подобно лямбда-интегразе, каждый из этих ферментов узнает специфическую последовательность ДНК в том мобильном генетическом элементе, рекомбинацию которого он катализирует. Отличает же эти ферменты от лямбда-интегразы то обстоятельство, что им не требуется специфической последовательности-мишени, а также то, что они не образуют ступенчатого (гетеродуплексного) соединения. Вместо этого под их воздействием в ДНК-мишени возникает ступенчатый (зигзагообразный) разрыв и появляются свободные концы цепей ДНК, которые затем ковалентно связываются со специфической последовательностью ДНК мобильного генетического элемента (рис. 5-67, *Б).* Благодаря этому весь мобильный элемент оказывается включенным в молекулу ДНК-мишени. По обе стороны от включившегося мобильного элемента в рекомбинантной молекуле ДНК остаются короткие одноцепочечные участки,

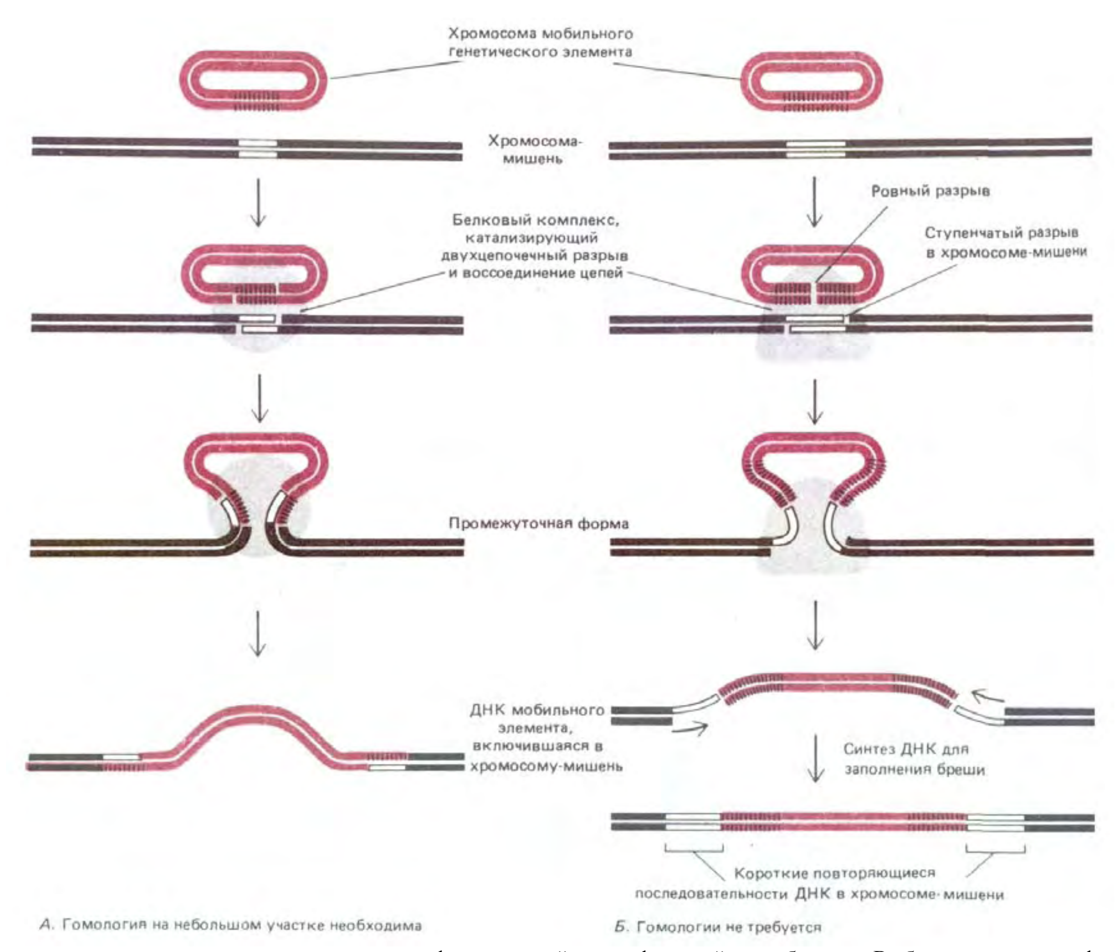


Рис. 5-67. Два механизма, используемых разными классами ферментов сайт-специфической рекомбинации. В обоих случаях специфичный фермент (показан *серым)* связывается с особой нуклеотидной последовательностью в хромосоме мобильного генетического элемента (отмечена *штриховкой)* и удерживает эту последовательность в тесном контакте с определенным участком хромосомы-мишени. *А.* Фермент делает ступенчатый разрез по обе стороны очень короткой гомологичной последовательности на обеих хромосомах (12 нуклеотидов в случае лямбда-интегразы), а затем соединяет цепи партнеров коротким ступенчатым соединением. *Б.* Фермент делает ступенчатый разрез в хромосоме-мишени и присоединяет выступающие ее концы к ровно срезанным концам мобильного элемента. В этом случае по обе стороны включившегося элемента появляются две короткие идентичные нуклеотидные последовательности - дупликации соответствующего участка ДНК-мишени (от 3 до 12 нуклеотидов, в зависимости от фермента).

которые достраиваются ДНК-полимеразой, завершающей процесс рекомбинации. Как ясно из рис. *5-61, Б,* при этом по обе стороны от включившегося элемента появляются две короткие идентичные нуклеотидные последовательности; по всей вероятности, ферменты сайт-специфической рекомбинации узнают именно эти примыкающие к мобильному элементу идентичные последовательности.

Один из таких неизбирательно действующих ферментов был выделен

в активной форме из бактериофага Ми. Подобно ДНК-топоизомеразе он способен катализировать все реакции разрыва и воссоединения без какого бы то ни было источника энергии (например, АТР). Данный фермент принадлежит одному из бактериофагов, однако есть все основания полагать, что подобные ферменты имеются и у других организмов, таких, например, как бактерии, плодовая мушка или человек. Предположение это вытекает из того, что мобильные генетические элементы у всех этих организмов сходны.

Заключение

Механизмы генетической рекомбинации обеспечивают возможность перемещения из хромосомы в хромосому больших фрагментов ДНК. Выработавшиеся для этого в процессе эволюции последовательности реакций таковы, что две спирали ДНК, разрываясь и воссоединяясь вновь, претерпевают минимальное повреждение, так что легко происходит восстановление двух целых хромосом. Существует два класса рекомбинационных событий. При общей рекомбинации начальные реакции зависят от комплементарных взаимодействий, происходящих на обширных участках между цепями двух двойных спиралей ДНК, вовлекаемых в рекомбинацию. Общая рекомбинация может поэтому происходить лишь между двумя гомологичными молекулами ДНК; и, хотя хромосомы при этом обмениваются генами, общая последовательность расположения генов в хромосоме не нарушается. При сайт-специфической рекомбинации реакции спаривания зависят от узнавания - при посредстве специального белка - двух нуклеотидных последовательностей, которым предстоит рекомбинировать; сколько-нибудь заметной гомологии при этом не требуется. Сайт-специфическая рекомбинация обычно изменяет относительное расположение нуклеотидных последовательностей в хромосомах.

5.5. Вирусы, плазмиды и транспозоны [42]

Знакомясь с основными генетическими механизмами, мы до сих пор сосредоточивали свое внимание на селективных преимуществах, которые они обеспечивают клетке. Мы убедились в том, что клетке для выживания совершенно необходимо сохранение генетической информации путем репарации ее ДНК, а для размножения клеток столь же необходимо быстрое и точное ее воспроизведение. Выживание вида в целом связано, как известно, с появлением новых, более приспособленных генетических вариантов, а оно в значительной мере облегчается перегруппировкой генов и случайным перераспределением последовательностей ДНК в результате генетической рекомбинации. Теперь нам предстоит познакомиться с группой генетических элементов, которые ведут себя как паразиты, т.е. используют генетические механизмы клетки для своих собственных нужд.

При некоторых условиях определенные нуклеотидные последовательности ДНК могут воспроизводиться независимо от остального генома. По степени независимости от клетки-хозяина эти последовательности весьма существенно различаются. Наиболее независимы хромосомы вирусов, потому что у вирусов есть белковые оболочки, благодаря которым они могут свободно переходить из клетки в клетку. В той или иной степени близки к вирусам (хотя и более зависимы от клетки) нуклеотидные последовательности, называемые плазмидами и транспозонами; у них нет белковой оболочки, и потому они могут реплицироваться только в одной-единственной клетке или в ее потомстве. Еще более примитивны некоторые последовательности ДНК, которые можно

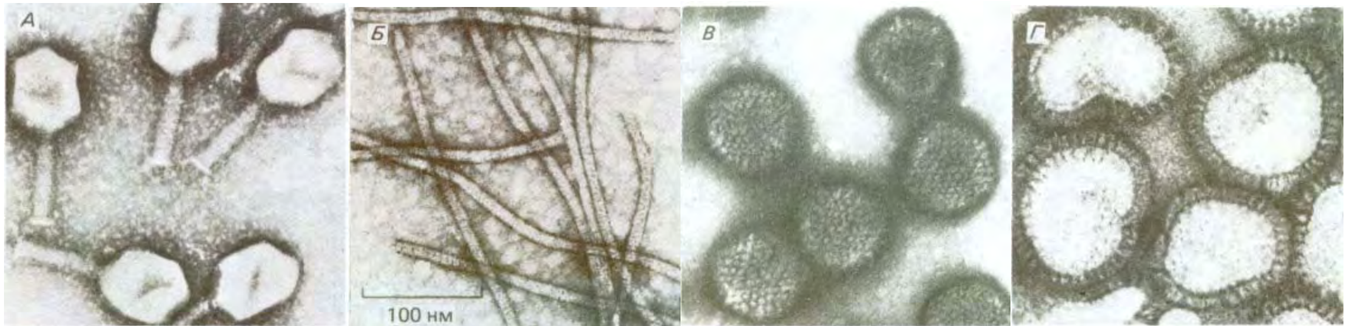


Рис. 5-68. Электронные микрофотографии вирусных частиц (метод негативного контрастирования). Все вирусы сфотографированы при одном и том же увеличении, масштаб указан на фото *Б. А.* Бактериофаг Т4 -крупный ДНК-содержащий вирус, заражающий бактерию *E. coli*. ДНК находится в головке бактериофага и впрыскивается в бактериальную клетку при помощи его цилиндрического хвоста. (С любезного разрешения James Paulson.) *Б.* Вирус X картофеля. Нитевидные частицы этого вируса растений содержат РНК-геном. (С любезного разрешения Graham Hills.) *В.* Аденовирус - ДНК-содержащий вирус, заражающий различные клетки человека. Снаружи вирусные частицы окружены белковой оболочкой - капсидом. (С любезного разрешения Mei Lie Wong.) *Г.* Вирус гриппа крупный РНК-содержащий вирус животных. Помимо белкового капсида у него имеется еще мембранная оболочка липидный бислой с выступающими из него включениями вирусного гликопротеина. (С любезного разрешения R. C. Williams, H. W. Fisher.)

предположительно рассматривать как мобильные генетические элементы на том основании, что в хромосомах клеток они встречаются во многих копиях, однако эти последовательности перемещаются или размножаются столь редко, что трудно решить, представляют ли они собой вообще отдельные генетические элементы.

Все такие псевдонезависимые элементы могут размножаться, лишь всемерно используя метаболизм клетки-хозяина, поэтому они служат удобным инструментом для исследования нормальных клеточных механизмов. Мы начнем свое обсуждение с вирусов, так как из всех мобильных генетических элементов они изучены наиболее полно. Затем мы рассмотрим свойства плазмид и транспозонов, которые иногда удивительно сходны с вирусами и, быть может, являются их предками.

5-39

5.5.1. Вирусы - это мобильные генетические элементы [43]

Вирусы впервые были описаны как болезнетворные агенты, которые размножаются только в клетках и имеют настолько малые размеры, что способны проходить через ультратонкие фильтры, задерживающие самые мелкие бактерии. До появления электронного микроскопа природа их оставалась неясной, хотя уже тогда высказывалось мнение, что это, возможно, просто гены, которые приобрели способность переходить из одной клетки в другую. В 1930-х годах использование ультрацентрифуги сделало возможным отделение вирусов от компонентов клетки-хозяина. В результате уже в начале 1940-х годов стало более или менее ясно, что все вирусы содержат нуклеиновые кислоты. Это укрепило исследователей в мысли, что вирусы и генетический материал выполняют сходные функции. Подтверждение такой точки зрения было получено при изучении вирусов бактерий *(бактериофагов).* В 1952 г. удалось показать, что в клетку бактерии-хозяина проникает одна только ДНК бактериофага (без его белка) и что именно она инициирует здесь процесс репликации, приводящий в конечном счете к появлению в инфицированной клетке нескольких сотен дочерних вирусных частиц. Таким образом, вирусы можно рассматривать как генетические элементы, одетые в защитную оболочку и способные переходить из одной клетки в другую. Размножение вирусов само по себе часто оказывается летальным для клетки, в которой оно происходит. Многие вирусы разрушают инфицированную клетку (вызывают ее *лизис),* что и дает возможность потомству вируса переходить в соседние клетки. Клинические симптомы вирусной инфекции во многих случаях отражают именно эту цитолитическую способность вируса. Высыпание при

инфекции вирусом герпеса или оспенная сыпь отражают, например, гибель эпителиальных клеток на отдельных пораженных участках кожи. Строение оболочки вируса, тип его нуклеиновой кислоты, способ проникновения в клетку и механизм размножения в клетке - все эти свойства у разных вирусов сильно варьируют. Электронные микрофотографии на рис. 5-68 дают представление о некоторых структурных различиях между вирусами.

5.5.2. Вирус заключен в белковый капсид или в мембранную оболочку [44]

Первоначально предполагалось, что наружная оболочка вирусов построена из белковых молекул какого-нибудь одного типа. Считалось, что вирусные инфекции начинаются с разъединения внутри клетки-хозяина хромосомы (т. е. нуклеиновой кислоты) вируса и его белковой оболочки. Далее следует самовоспроизведение хромосомы с образованием большого числа ее копий и синтез вирусоспецифичных белков оболочки. Затем происходит образование дочерних вирусных частиц в результате спонтанной сборки белковой оболочки вокруг дочерних вирусных хромосом (рис. 5-69).

Теперь мы отдаем себе отчет в том, что эти первые описания, хотя и верные в общем виде, давали упрощенное представление о чрезвычайно разнообразных жизненных циклах вирусов. Во-первых, белковая оболочка (или **капсид)** почти у всех вирусов состоит из полипептидных цепей более чем одного типа, причем эти цепи нередко сгруппированы в несколько слоев. Во-вторых, у многих вирусов их белковый капсид окружен еще и мембраной, в которую помимо белка входят и липиды. У многих из этих вирусов сборка наружной оболочки происходит в плазматической мембране клетки-хозяина, и дочерние вирусные частицы выходят наружу, отпочковываясь от этой плазматической мембраны (рис. 5-70). Отпочковывание позволяет потомству вируса покидать клетку, не нарушая ее плазматической мембраны, т. е. не убивая клетку. Липидные компоненты мембраны вируса идентичны липидам плазматической мембраны клетки-хозяина, тогда как белки, присутствующие в липидном бислое, вирусоспецифичны. Сборку вирусной мембраны в плазматической мембране клетки-хозяина мы обсудим в гл. 8, что же касается сборки белкового капсида вируса, то ее иллюстрирует рис. 3-43.

5-45

5.5.3. Геномы вирусов представлены разнообразными формами, а генетическим материалом у них может быть как ДНК, так и РНК [45]

Когда удалось расшифровать структуру ДНК, естественно было сделать вывод, что вся генетическая информация хранится именно в этой двухспиральной форме, поскольку ее преимущества в поддержании стабильности ДНК и в смысле возможности репарации казались совершенно неоспоримыми. Случайное повреждение одной из полинуклеотидных цепей, действительно, всегда может быть исправлено при помощи комплементарной цепи. Однако это преимущество представляется несущественным, когда речь идет о крошечных вирусных хромосомах, насчитывающих всего несколько тысяч нуклеотидов, - вероятность их случайного повреждения очень невелика в сравнении с риском, которому подвергается клеточный геном, содержащий миллионы нуклеотидов.

По этой причине генетическая информация вирусов может храниться в разнообразных и необычных формах, в частности в форме РНК. Роль



Рис. 5-69. Простейший жизненный цикл вируса. Представленный здесь гипотетический вирус содержит небольшую двухцепочечную молекулу ДНК, кодирующую единственный вирусный белок, из которого построен капсид вируса. Вирусов с таким простым строением мы не знаем.



Рис. 5-70. Электронная микрофотография тонкого среза животной клетки, от которой отпочковывается несколько частиц вируса, заключенного в мембранную оболочку (вирус леса Семлики). Геном этого вируса представлен одноцепочечной РНК. (С любезного разрешения M. Olsen, G. Griffiths.)

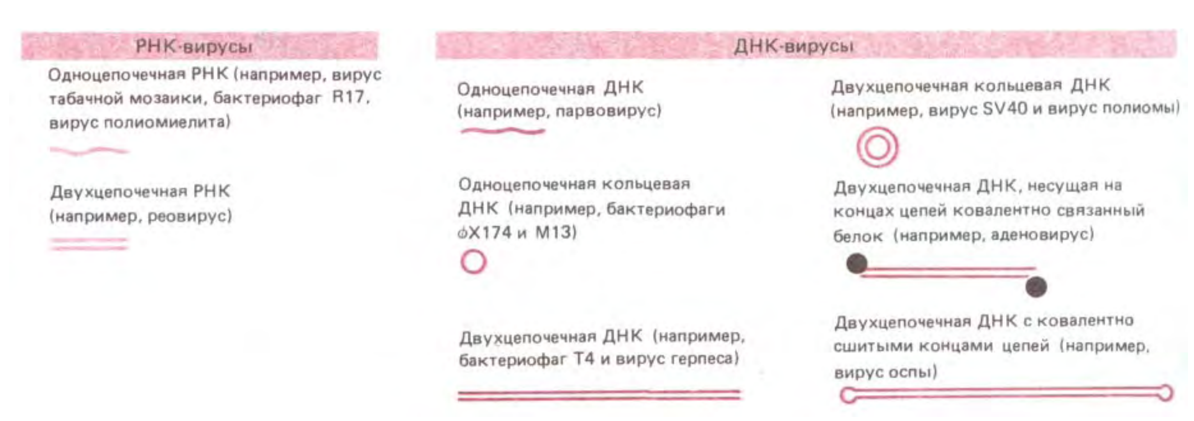


Рис. 5-71. Схематическое изображение (масштабы не соблюдены) различных типов вирусных геномов. У самых мелких вирусов геном состоит всего из нескольких генов и генетическим материалом может быть у них как ДНК, так и РНК; у наиболее крупных вирусов геном всегда представлен двухцепочечной ДНК, включающей сотни генов. Такие особенности хромосом, как кольцевая форма молекул ДНК или особое строение концов цепей у линейных молекул, позволяют вирусам избежать трудностей, связанных с репликацией нескольких последних нуклеотидов на конце цепи ДНК.

хромосомы вируса может играть одноцепочечная РНК (вирус табачной мозаики), двухцепочечная спираль РНК (реовирус), кольцевая одноцепочечная ДНК (бактериофаги M13 и ФXI74) или линейная одноцепочечная ДНК (парвовирусы). Правда, первыми среди хромосом вирусов были изучены простые линейные двойные спирали ДНК, но потом выяснилось, что столь же часто встречаются кольцевые двойные спирали или более сложные формы линейных двойных спиралей ДНК. Есть вирусы, у которых к 5'-концам цепей ДНК ковалентно присоединен белок, а у очень крупных вирусов оспы две комплементарные цепи ДНК на одних концах соединены фосфодиэфирными связями (рис. 5-71). Для каждого типа вирусного генома характерна своя особая энзимология репликации, а потому он должен нести в себе информацию не только о белках, образующих оболочку вируса, но также и об одном или нескольких ферментах, необходимых для репликации вирусной нуклеиновой кислоты.

5-40

5.5.4. Хромосома вируса содержит информацию для синтеза ферментов, участвующих в репликации вирусной нуклеиновой кислоты [46]

Количество информации, которую вирус привносит в инфицируемую клетку, чтобы обеспечить себе воспроизведение, различается у разных вирусов весьма заметно. Так, в ДНК сравнительно крупного бактериофага T4 закодировано не менее 30 различных ферментов, обеспечивающих избирательную и быструю репликацию хромосомы бактериофага T4 в ущерб репликации ДНК клетки-хозяина, т. е. *E. coli* (рис. 5-72). Эти белки участвуют в непрерывных циклах репликации Т4-ДНК и осуществляют избирательное включение 5-гидроксиметилцитозина, который в Т4-ДНК замещает цитозин. В геноме бактериофага T4 закодированы также и нуклеазы, избирательно разрушающие ДНК *E. coli* (геном самого бактериофага из-за необычного состава оснований не подвержен действию этих нуклеаз). Кроме того, в нем закодированы белки. изменяющие молекулы бактериальной РНК-полимеразы таким образом, что они на разных стадиях инфекции транскрибируют различные группы генов бактериофага.

Более мелкие ДНК-содержащие вирусы, например обезьяний вирус SV40 или мельчайший бактериофаг ФXI74, несут в себе гораздо меньше генетической информации и гораздо больше зависят от ферментов клетки-хозяина как в синтезе своих белков, так и в синтезе своей ДНК. Они подчиняют себе и используют для своих нужд клеточные ферменты, участвующие в репликации ДНК, в том числе и ДНК-полимеразу.

Однако даже в геноме самых мелких ДНК-вирусов закодированы ферменты, избирательно инициирующие синтез их собственной ДНК, для чего они узнают на хромосоме вируса особую нуклеотидную последовательность - *точку начала репликации.* Это существенно, потому что вирус может успешно размножаться лишь при том условии, если ему удастся игнорировать регуляторные сигналы клетки, которые в противном случае не дадут вирусной ДНК удваиваться более чем один раз в каждом клеточном цикле. Мы до сих пор не знаем, как эукариотические клетки регулируют синтез своей ДНК, и можно надеяться, что знакомство с механизмами, при помощи которых вирусы избавляются от этой регуляции (а их изучать, разумеется, гораздо легче), даст нам ключ к пониманию регуляторных механизмов клетки-хозяина.

К репликации РНК-вирусов предъявляются особые требования, поскольку для воспроизведения своего генома они должны копировать молекулы РНК, что означает полимеризацию нуклеозидтрифосфатов на РНК-матрице. Клетки, как правило, не располагают ферментами для осуществления этой реакции, поэтому даже в мельчайших вирусах должны быть закодированы их собственные РНК-зависимые полимеразы нуклеиновых кислот.

Рассмотрим теперь более подробно механизмы репликации разных типов вирусов.

5-42

5.5.5. РНК-вирусы и ДНК-вирусы реплицируются путем образования комплементарных цепей [47]

Репликация геномов РНК-вирусов точно так же, как и репликация ДНК, связана с образованием комплементарных полинуклеотидных цепей. У большинства РНК-вирусов этот процесс катализируют РНК-зависимые РНК-полимеразы *(репликазы),* кодируемые РНК-хромосомой вируса. Эти ферменты часто включаются в дочерние вирусные частицы, и тогда при вирусной инфекции они уже сразу имеются в наличии, т.е. могут немедленно начинать репликацию вирусной РНК. У так называемых *вирусов с негативным геномом,* к которым принадлежат, в частности, вирусы гриппа и везикулярного стоматита, репликазы всегда включаются в капсид. Вирусы этой группы называются так потому, что у них инфицирующая цепь не кодирует никаких белков; только комплементарная ей цепь несет необходимые для этого нуклеотидные последовательности. Таким образом, инфицирующая цепь не может индуцировать размножение вируса без предобразованной репликазы. У *РНК-вирусов с позитивным геномом,* например у вируса полиомиелита, дело обстоит иначе: здесь вирусная РНК может выступать в роли мРНК, и у этих вирусов «голый» геном инфекционен.

Синтез вирусной РНК начинается всегда на 3'-конце РНК-матрицы (т. е. с 5'-конца новой молекулы РНК) и идет до тех пор, пока не будет достигнут 5'-конец матрицы. Никаких механизмов, которые корректировали бы синтез вирусной РНК, нет, и частота ошибок здесь примерно та же, что и при транскрипции ДНК (в среднем одна ошибка на 10^4 нуклеотидов). Однако отсутствие корректирующих механизмов серьезным образом не сказывается на репликации из-за небольших размеров РНК-хромосомы вируса. Геномы всех РНК-вирусов невелики в сравнении с геномами крупных ДНК-содержащих вирусов, и это является прямым следствием того, что у них механизм репликации более примитивен.

У всех ДНК-вирусов репликация инициируется в точке начала репликации, к которой присоединяются специальные инициаторные белки, способные привлекать к себе репликационные ферменты клетки-

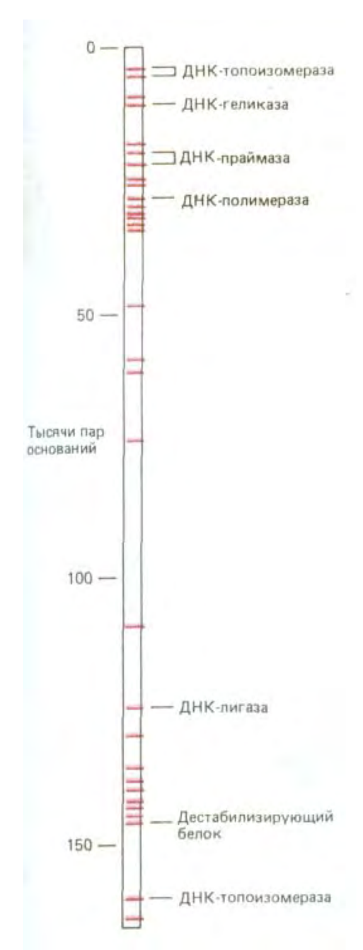


Рис. 5-72. Хромосома бактериофага Т4, на которой обозначены больше 30 генов, участвующих в репликации его ДНК. Геном бактериофага Т4 насчитывает свыше 160000 пар нуклеотидов, кодирующих более 200 различных белков, в том числе и белков, участвующих в репликации ДНК (некоторые из них здесь отмечены). Среди остальных белков много таких, которые участвуют в сборке головки и хвостового отростка (см. рис. 5-68, *А).*

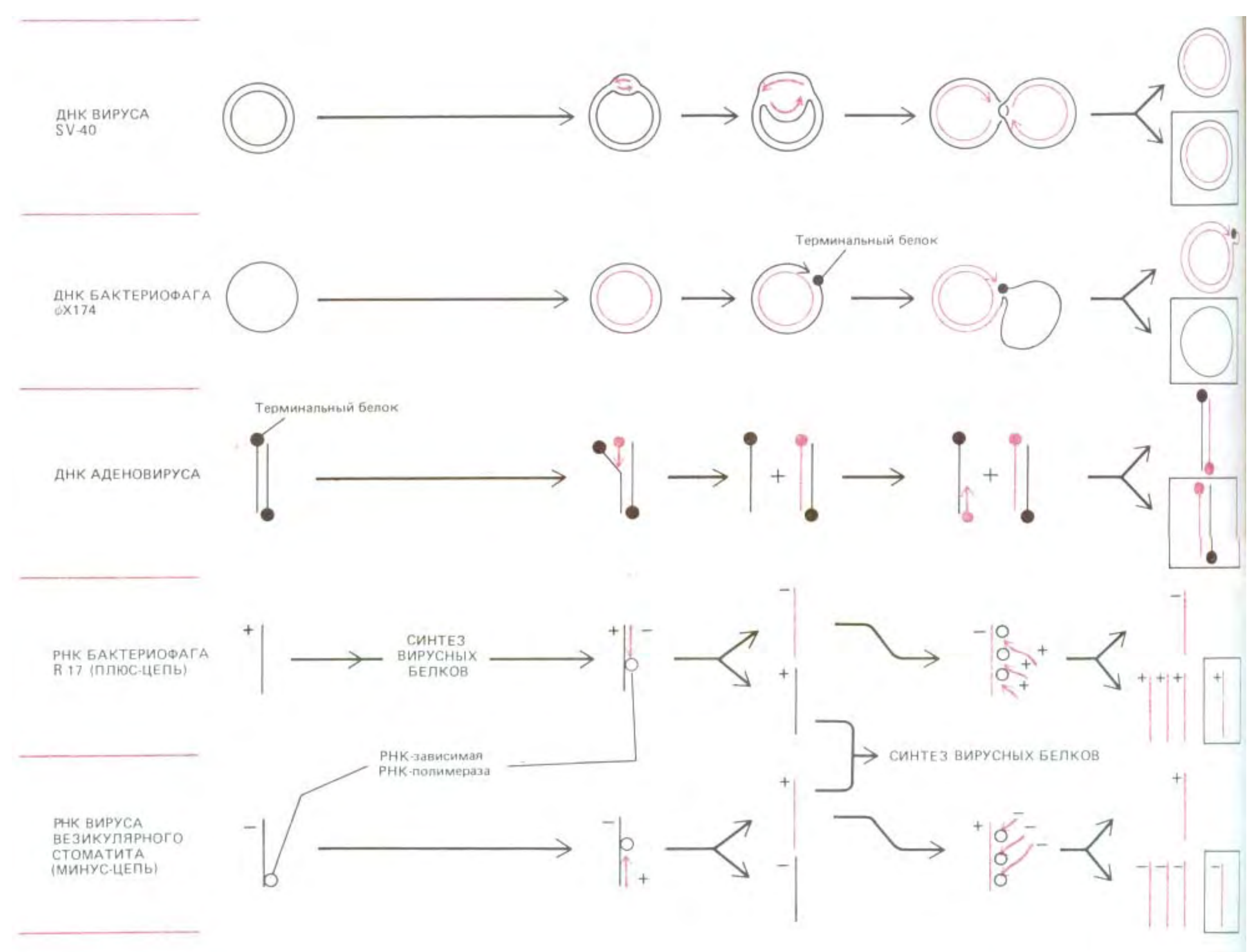


Рис. 5-73. Примеры, иллюстрирующие разнообразные способы репликации вирусных геномов. В двух случаях, как мы видим, к концам цепей ДНК ковалентно присоединены терминальные белки, эти белки играют важную роль в соответствующем процессе репликации. Обратите внимание на главное различие между РНК-вирусами с *позитивными* и *негативными* геномами: оно заключается в том, что вирусы с «минус»-цепью, прежде чем образовать вирусные белки, должны синтезировать «плюс»-цепь. Для этой цели капсид РНК-вируса должен нести в себе одну или несколько молекул вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы). Справа в рамке показан для каждого случая конечный РНК- или ДНК-продукт, идентичный инфицирующему вирусному геному, представленному слева.

хозяина (см. разд. 5.3.9). Существует много различных путей репликации вирусных геномов. Их сложность объясняется необходимостью так или иначе решить проблему репликации концов простой линейной молекулы ДНК, при том что имеющаяся ДНК-репликаза не способна начинать синтез в отсутствие затравки. Проблема эта решается у ДНК-вирусов различными способами; есть вирусы с кольцевой хромосомой, которая вообще не имеет концов; у некоторых вирусов с линейным геномом терминальные нуклеотидные последовательности повторяются или концы хромосом образуют петли; наконец, имеются вирусы, геном которых несет особые терминальные белки, способные непосредственно «включать» ДНК-полимеразу.

На рис. 5-73 представлены некоторые способы репликации геномов, встречающиеся у вирусов.

5-43

5.5.6. Хромосомы вирусов способны включаться в хромосомы клетки-хозяина [48]

Проникновение вирусной хромосомы в клетку далеко не всегда приводит к немедленному размножению вирусных частиц. Многие вирусы могут существовать в латентной форме: их геномы при этом хотя и присутствуют в клетке, остаются неактивными; образования дочерних

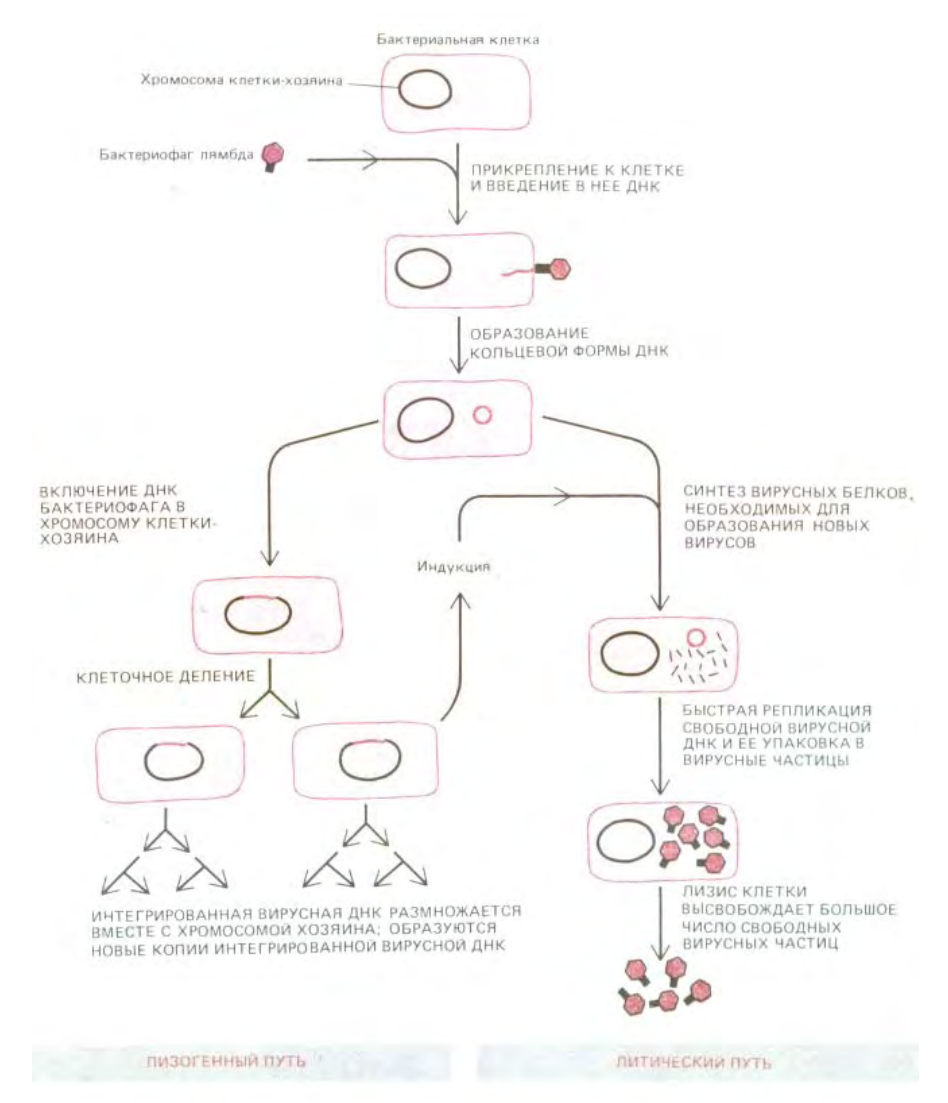


Рис. 5-74. Жизненный цикл бактериофага λ. Геном бактериофага состоит приблизительно из 50000 пар нуклеотидов и кодирует около 50 белков. Его двухцепочечная ДНК способна существовать как в линейной, так и в кольцевой форме. Развитие бактериофага может пойти, как это здесь изображено, и по литическому, и по лизогенному пути. Повреждение ДНК клетки, находящейся в лизогенном состоянии, вынуждает интегрированную фаговую ДНК (профаг) выйти из хромосомы хозяина и начать литический цикл. Включение фаговой ДНК в хромосому хозяина и выход из хромосомы осуществляются путем сайт-специфической генетической рекомбинации, катализируемой особым белком бактериофага λ, так называемой интегразой.

частиц не происходит. О способности вирусов существовать в латентной форме стало известно, когда выяснилось, что многие бактерии, казалось бы неинфицированные, продуцируют бактериофаг, если их подвергнуть облучению ультрафиолетом. После этого были проведены эксперименты, которые показали, что у таких *лизогенных бактерий* в хромосому включена полная хромосома вируса. Эти интегрированные вирусные хромосомы стали называть **провирусами** (профагами).

Бактериофаги, способные включаться в бактериальные хромосомы, называются *лизогенизирующими бактериофагами.* Наиболее полно изучен среди них бактериофаг лямбда (λ), о ферменте которого, лямбда-интегразе, мы уже говорили. Когда бактериофаг Х заражает подходящую клетку *E. coli,* он обычно размножается в ней и образует несколько сотен дочерних фаговых частиц, которые выходят наружу в момент лизиса клетки; это так называемый *литический путь инфекции.* Гораздо реже линейные инфицирующие молекулы ДНК замыкаются в кольцо и включаются в кольцевую хромосому бактерии-хозяина путем сайт-специфической рекомбинации (см. разд. 5.4.7). По завершении такой интеграции образовавшаяся лизогенная бактерия, несущая хромосому бактериофага λ в виде профага, размножается, как обычно, до тех пор, пока на нее не воздействует какой-нибудь повреждающий внешний

фактор, например ультрафиолетовые лучи или ионизирующее излучение. Это воздействие вынуждает интегрированный профаг выйти из хромосомы хозяина и начать обычный, свойственный вирусу цикл размножения. Интегрированный профаг, таким образом, не осужден на гибель вместе с поврежденной клеткой-хозяином; у него есть шанс ускользнуть из нее и перейти в соседнюю неповрежденную клетку *E. coli* (рис. 5-74).

5.5.7. Непрерывный синтез вирусных белков может превращать нормальные клетки в раковые [49]

В животных клетках, как и у бактерий, для размножения вирусов существует помимо литического еще и другой путь. Те животные клетки, в которых ДНК-вирусы размножаются литическим путем, ведущим к гибели клетки, принято называть *пермиссивными.* Клетки, в которых размножение вирусов блокируется, называются *непермиссивными;* вирусная хромосома в таких случаях либо включается в геном клетки-хозяина и в дальнейшем размножается вместе с ним, либо образует плазмиду - кольцевую молекулу ДНК, репликация которой регулируется и не ведет к гибели клетки. Иногда это вызывает в непермиссивных клетках определенное генетическое изменение, в результате которого начинается их неконтролируемый рост, т.е. нормальные клетки превращаются в раковые. Соответствующий ДНК-вирус называют в таких случаях *опухолевым ДНК-вирусом, а* превращение, о котором идет речь, - *вирусной неопластической трансформацией.* Среди опухолевых ДНК-вирусов наиболее полно изучены два представителя паповавирусов, а именно SV40 и вирус полиомы. Выяснилось, что их трансформирующая способность зависит от нескольких вирусных белков, кооперативное действие которых переводит покоящиеся клетки из G_0-фазы в S-фазу (см. разд. 3.3). В пермиссивных клетках этот переход в S-фазу делает доступными вирусу все репликационные ферменты клетки-хозяина, необходимые для синтеза вирусной ДНК. В непермиссивной клетке синтез провирусом этих вирусных белков подавляет часть нормальных регуляторных механизмов и самой клетки, и всего ее потомства.

5.5.8. Опухолевые РНК-вирусы принадлежат к классу ретровирусов [50]

Особым образом ведут себя *опухолевые РНК-вирусы:* проникновение их в пермиссивную клетку часто ведет одновременно и к нелетальному для клетки высвобождению дочерних вирусных частиц (отпочковывающихся от клеточной поверхности), и к стойкому генетическому изменению в инфицированной клетке, которое превращает эту клетку в раковую. Как может заражение вирусом вызвать стойкое генетическое изменение, было непонятно до тех пор, пока не был открыт фермент *обратная транскриптаза,* с помощью которого цепи инфицирующей РНК этих вирусов транскрибируются в комплементарные им цепи ДНК. Опухолевые РНК-вирусы, к которым относится первый хорошо изученный опухолевый вирус, а именно **вирус саркомы Рауса,** являются представителями крупного класса вирусов, так называемых **ретровирусов.** Название это отражает тот факт, что часть их жизненного цикла составляет процесс, обратный нормальной транскрипции, т. е. транскрипции ДНК в РНК. К ретровирусам относится и вирус СПИДа (спонтанно приобретенного иммунодефицита).

Рис. 5-75 иллюстрирует жизненный цикл одного из ретровирусов. Фермент **обратная транскриптаза** представляет собой необычную форму ДНК-полимеразы, способную использовать в качестве матрицы и РНК.

и ДНК; этот фермент закодирован в РНК ретровируса и при образовании дочерних вирусных частиц всегда упаковывается в их капсид. Когда одноцепочечная РНК ретровируса проникает в клетку, обратная транскриптаза сначала синтезирует ДНК-копию этой цепи РНК, в результате чего образуется гибридная ДНК-РНК-спираль, которую тот же фермент использует затем для образования двойной спирали, состоящей уже из двух цепей ДНК. Эта ДНК-копия вирусного РНК-генома включается в хромосому клетки-хозяина. Включению способствует закодированный вирусом фермент, осуществляющий сайт-специфическую рекомбинацию; он узнает определенную нуклеотидную последовательность в вирусной ДНК и катализирует включение вирусной ДНК практически в любой участок хромосомы клетки-хозяина (см. рис. 5-67, *Б).* Следующий этап инфекционного процесса составляет транскрипция интегрированной вирусной ДНК РНК-полимеразой клетки-хозяина; в результате появляется большое число молекул вирусной РНК, идентичных исходному инфицирующему геному. Завершается процесс трансляцией этих молекул РНК с образованием капсидных и мембранных белков, а также обратной транскриптазы; наконец, происходит сборка новых вирусных частиц, окруженных оболочкой, которые отпочковываются от клеточной мембраны (см. рис. 5-75).

Как РНК-, так и ДНК-содержащие опухолевые вирусы вызывают неопластическую трансформацию клеток, потому что присутствие в клетке вирусной ДНК индуцирует синтез новых белков, нарушающих регуляцию клеточного деления. Гены, кодирующие синтез таких белков, называются *онкогенами. У* опухолевых ДНК-вирусов онкогены обычно кодируют нормальные вирусные белки, необходимые для размножения вируса. Иначе обстоит дело у опухолевых РНК-вирусов: онкогены, которые они несут, представляют собой модифицированные формы нормальных генов клетки-хозяина - они для размножения вируса не требуются. Поскольку в капсид ретровируса может уместиться лишь некоторое ограниченное количество РНК, необходимые онкогенные последовательности нуклеотидов часто замещают собой существенную часть генома ретровируса и вирус оказывается дефектным. Мы расскажем позже (см. разд. 13.4.2 и разд. 21.2.1), почему изучение вирусных онкогенов послужило ключом к пониманию причин и природы рака, а также к познанию тех механизмов, которые в норме регулируют рост и деление клеток у многоклеточных организмов.

5.5.9. Некоторые транспозоны очень сходны с ретровирусами [51]

Поскольку многие вирусы способны включаться в хромосомы клеток-хозяев и выходить из них, можно предположить, что все крупные геномы содержат то или иное число различных провирусов. Вполне вероятно, что в этих геномах имеется также и ряд мобильных последовательностей ДНК, которые не образуют вирусных частиц и не могут покинуть клетку; их называют **транспозонами.** Транспозоны (размеры их колеблются от нескольких сотен до десятков тысяч нуклеотидных пар) обычно присутствуют в клетке в нескольких копиях. Они представляют собой нечто вроде крошечных паразитов, таящихся в хромосомах. Время от времени любой такой транспозон активируется и под влиянием собственного фермента, катализирующего сайт-специфическую рекомбинацию, переходит в какой-нибудь иной участок ДНК в пределах той же клетки. Этот процесс носит название *транспозиции.* Ферменты, катализирующие транспозицию, - их называют *транспозазами - по* большей части закодированы в ДНК самого транспозона. Большинство транспозонов переходит с места на место крайне редко (у бактерий приблизительно 1 раз на 10^5 генераций), так что их очень трудно отличить от

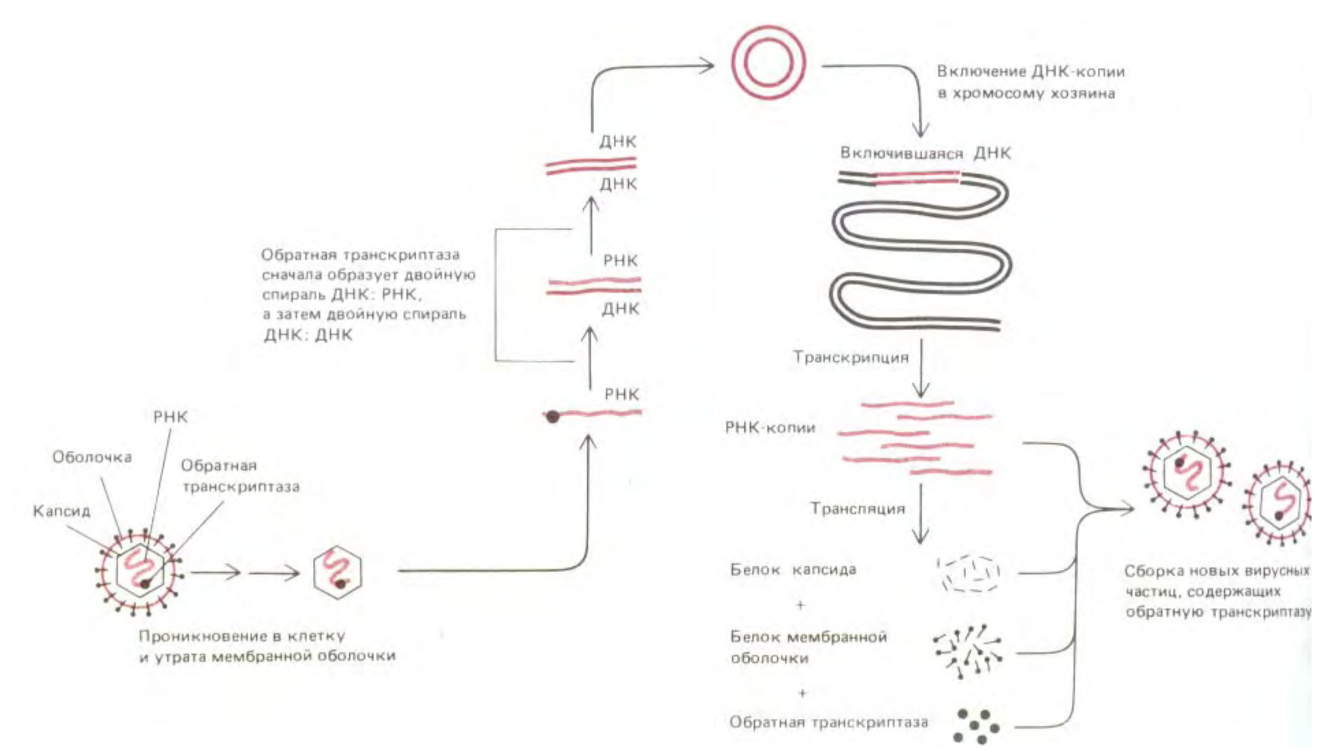


Рис. 5-75. Жизненный цикл одного из ретровирусов. Геном ретровируса представляет собой молекулу РНК, насчитывающую около 8500 нуклеотидов; в каждой вирусной частице упаковано две такие молекулы. Фермент обратная транскриптаза представляет собой ДНК-полимеразу, которая образует сначала ДНК-копию вирусной молекулы РНК, а затем вторую цепь ДНК, так что в итоге получается ДНК-копия РНК-генома. Включение этой двойной спирали ДНК в хромосому клетки-хозяина, катализируемое вирусным белком, необходимо для синтеза новых молекул вирусной РНК, осуществляемого РНК-полимеразой клетки-хозяина.

неподвижных участков хромосомы. Не знаем мы также и того, что служит пусковым механизмом для этого процесса.

Механизмы транспозиции могут быть различными. У одного крупного семейства транспозонов используемый для этой цели механизм полностью совпадает с частью жизненного цикла ретровируса. Такие элементы - их называют *ретротранспозонами* - известны у столь далеких друг от друга организмов, как дрожжи, плодовая мушка и млекопитающие. Одним из наиболее хорошо изученных ретротранспозонов является обнаруженный у дрожжей элемент Ty1. На первом этапе его транспозиции происходит транскрипция всего элемента с образованием РНК-копии, состоящей более чем из 5000 нуклеотидов. В этом РНК-транскрипте закодирована обратная транскриптаза, которая синтезирует кольцевую двухцепочечную ДНК-копию молекулы РНК через промежуточное соединение - гибридную двойную спираль РНК-ДНК точно так же, как это происходит в клетке, инфицированной ретровирусом (см. рис. 5-75). Аналогия сохраняется и далее, когда кольцевая ДНК включается в случайно выбранный участок хромосомы. Как и у ретровируса, включение осуществляется по типу сайт-специфической рекомбинации, представленной на рис. 5-67, *Б;* для этого, по всей вероятности, используется транспозаза, также закодированная в упомянутом выше длинном РНК-транскрипте. При всем поразительном сходстве с ретровирусом элемент Ty1 отличается от него тем, что будучи лишен функциональной белковой оболочки, он может перемещаться лишь внутри какой-нибудь одной клетки или может быть передан ее потомкам.

5-44

5.5.10. У другой группы транспозонов переход совершается непосредственно из одного участка генома в другой [52]

Многие транспозоны отличаются от ретротранспозонов тем, что они, по-видимому, никогда не существуют вне хромосомы клетки-хозяина; транспозазы, катализирующие их перемещение, действуют на ДНК

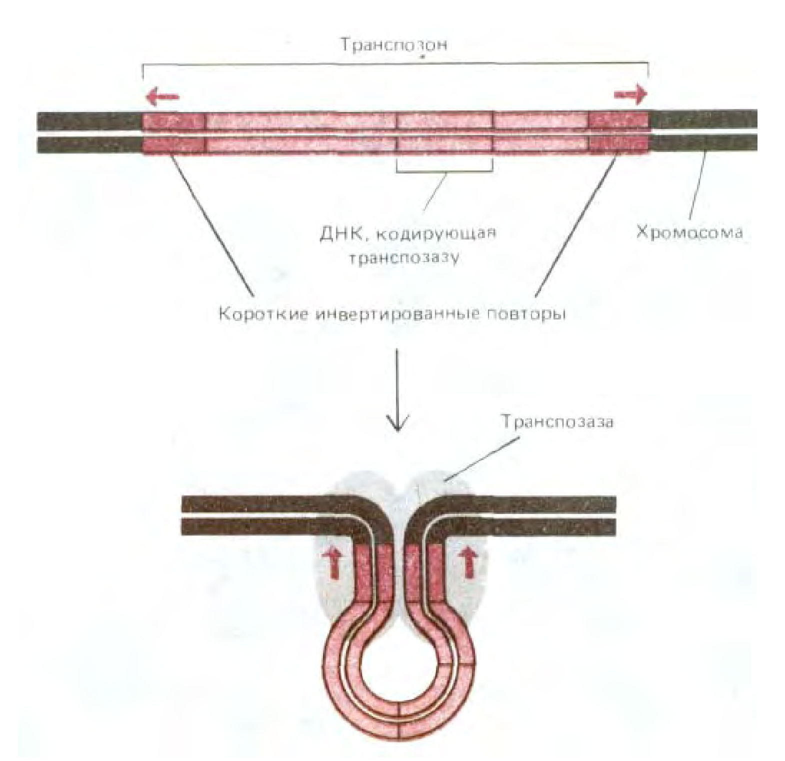


Рис. 5-76. Структура транспозона, перемещающегося непосредственно из одного участка хромосомы в другой. Узнаются транспозоны этого типа по наличию у них на концах двух инвертированных повторяющихся последовательностей ДНК. Как показали эксперименты, именно эти повторяющиеся последовательности (длиной иногда не более 20 нуклеотидов) требуются для того, чтобы находящаяся между ними ДНК могла быть перенесена на новое место специальным ферментом транспозазой. На схеме показан белковый комплекс, образующийся на первом этапе процесса транспозиции. Дальнейшие события включают разрыв ДНК на концах инвертированных повторяющихся последовательностей и ряд других этапов, которые можно рассматривать как модификацию схемы, представленной на рис. 5-67, *Б* (см. также рис. 5-77).

транспозона в то время, как он пребывает в интегрированном состоянии в геноме хозяина. Транспозаза, как полагают, связывается с короткими нуклеотидными последовательностями, повторяющимися в инвертированном виде на обоих концах транспозона, и тем самым сближает эти концы для последующей рекомбинации, которую она катализирует (рис. 5-76). У некоторых транспозонов механизм транспозиции сводится всего лишь к разрыву и воссоединению ДНК; два конца транспозона присоединяются при этом к концам хромосомы в другом ее участке, там, где в ней возник ступенчатый разрыв (см. рис. 5-67, *Б).* Такие транспозоны переходят непосредственно из одного участка хромосомы в другой без сопутствующей репликации ДНК. Однако при сшивании хромосомы в том месте, откуда был удален транспозон, ее нуклеотидная последовательность нередко нарушается, т. е. в этом участке хромосомы возникает мутация.

Существуют также транспозоны, при перемещениях реплицирующиеся. Лучше других изучен пример, в котором сайт-специфическая рекомбинация «запускает» локальный синтез ДНК; одна копия реплицировавшегося транспозона включается при этом в какой-либо новый случайно выбранный участок хромосомы, а другая остается в старом участке (рис. 5-77). Механизм процесса очень близок к тому, который мы только что описали для нерепликативного пути. Известны транспозоны, способные использовать как гот, так и другой путь.

Перемещаясь сами, транспозоны всех типов прихватывают иногда и соседние нуклеотидные последовательности генома хозяина или вызывают в них перестройки. Часто результатом оказываются делеции в соседних участках генома или перенос соседних последовательностей на новое место. Присутствие в хромосомах транспозонов делает их нуклеотидные последовательности менее стабильными, нежели это считалось ранее; возможно, именно эти элементы несут ответственность за многие изменения в геномах, существенные для эволюции.

Можно ли приписать транспозонам еще одну важную эволюционную роль, а именно можно ли считать их древнейшими предками вирусов? Что касается ретровирусов, то они, по-видимому, действительно про-



Рис. 5-77. Схема, иллюстрирующая перемещение в хромосоме одного из типов транспозонов. Транспозон этого типа реплицируется в процессе транспозиции, так что, появляясь в новом участке хромосомы, он в то же время в виде одной из копий остается и в старом участке. Две инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК на концах транспозона представлены здесь красными прямоугольниками. В начале процесса транспозиции транспозаза разрывает одну из двух цепей ДНК на обоих концах транспозона, чтобы мог начаться синтез ДНК, для которого транспозон служит матрицей. Синтез идет путем добавления нуклеотидов к 3'-концам нуклеотидных последовательностей ДНК хромосомы. Известны и последующие этапы этого процесса, но весь он в целом слишком сложен для того, чтобы рассматривать его здесь.

изошли от ретротранспозонов. Однако нельзя упускать из виду, что все ныне существующие транспозоны теснейшим образом зависят от метаболизма ДНК, у первых же клеток геномы состояли, как полагают, не из ДНК, а из РНК. Очевидно поэтому, путь к самым истокам происхождения вирусов следует искать именно в метаболизме РНК.

5.5.11. Большинство вирусов, вероятно, возникло в процессе эволюции из плазмид [53]

Даже самые крупные вирусы не способны осуществлять биосинтетические процессы самостоятельно; они зависят в этом отношении от клеток-хозяев. Среди известных нам вирусов ни один не имеет собственных рибосом и не обладает способностью синтезировать АТР, в котором он нуждается. Ясно поэтому, что клетки должны были появиться в процессе эволюции раньше вирусов. Предшественниками вирусов были, вероятно, небольшие фрагменты нуклеиновых кислот, которые приобрели способность размножаться независимо от хромосом их клеток-хозяев. Такие независимо размножающиеся элементы - их назвали **плазмидами** - реплицируются самостоятельно. Плазмиды встречаются как в ДНК-, так и в РНК-форме, и так же как вирусы, они содержат особую нуклеотидную последовательность, которая служит точкой начала репликации. Однако в отличие от вирусов они не способны синтезировать белок для построения белковой оболочки и, не имея такой оболочки, не могут свободно переходить из клетки в клетку. Многие из них не способны также включаться в хромосому клетки-хозяина.

Возможно, что первые РНК-плазмиды напоминали собой *вироиды,* встречающиеся в некоторых растительных клетках. Эти небольшие кольцевые молекулы РНК (не более 300-400 нуклеотидов) размножаются, хотя они и не кодируют никаких белков (см. рис. 10-61). Не имея капсида, вироиды существуют лишь как голые молекулы РНК и переходят от растения к растению только в том случае, когда и донорная клетка, и клетка-реципиент оказываются поврежденными, т. е. когда между ними не существует мембранного барьера, который вироид не способен преодолеть. Под давлением естественного отбора такие независимо реплицирующиеся элементы могли, очевидно, включать в себя те нуклеотидные последовательности клетки-хозяина, которые облегчали их самостоятельное размножение, в том числе и некоторые последовательности, кодирующие белки. Некоторые известные нам плазмиды действительно достаточно сложны: в них закодированы белки и молекулы РНК, регулирующие их размножение, а также белки, регулирующие их распределение между дочерними клетками. Самые крупные среди известных плазмид представляют собой кольцевые

двухцепочечные спирали ДНК, насчитывающие свыше 100000 пар нуклеотидов.

Первый вирус возник, вероятно, когда у плазмиды появился ген, кодирующий белок капсида. Однако в капсиде умещается ограниченное количество нуклеиновой кислоты, и, значит, число генов, которые вирус может в себе заключать, лимитируется размерами капсида. Будучи вынуждены оптимальным образом использовать свой небольшой геном, некоторые мелкие вирусы (вроде бактериофага ФХI74) обзавелись в ходе эволюции *перекрывающимися генами,* в которых часть нуклеотидной последовательности, кодирующей один какой-нибудь белок, используется (с той же или с иной рамкой считывания) для кодирования второго белка. У других вирусов в процессе эволюции возникли более крупные капсиды, что должно было дать им возможность приобретать новые полезные гены.

Обладая уникальной способностью к переносу ДНК через видовые барьеры, вирусы, почти несомненно, играли важную роль в эволюции тех организмов, которые они инфицируют. Многие вирусы часто вступают в рекомбинацию как друг с другом, так и с хромосомами клеток-хозяев; при этом они захватывают случайные фрагменты хромосом и переносят их в другие клетки или другие организмы. Кроме того, включившиеся в геном хозяина (интегрированные) копии вирусной ДНК (провирусы) становятся постоянными компонентами генома у большей части организмов. Примеры таких провирусов мы находим в семействе бактериофагов λ и среди так называемых эндогенных ретровирусов, многочисленные копии которых обнаруживаются в геномах позвоночных. Интегрированная вирусная ДНК часто видоизменяется так, что способность образовывать полноценный вирус у нее утрачивается, но она все еще может кодировать белки, причем некоторые из них оказываются полезными для клетки. Вирусы, следовательно, так же, как и половой процесс, создают возможности для ускорения эволюции, открывая для нее такой путь, как смешение генофондов различных организмов.

С помощью вирусов отдельные последовательности ДНК переносятся из генома в геном (феномен *трансдукции).* Таким образом, вирусы можно использовать как инструмент для переноса генов из одной клетки в другую. Вирусы, а также очень близкие к ним плазмиды и транспозоны играют важную роль в биологии клетки и по другим причинам. Благодаря тому что они относительно просто устроены, изучение процесса их размножения продвигается чрезвычайно быстро, а полученные при этом данные позволяют судить об основных генетических механизмах клеток. Кроме того, вирусы и плазмиды стали главными элементами в технологии рекомбинантной ДНК. К рассмотрению этой последней темы мы теперь и перейдем.

Заключение

Вирусы — это инфекционные частицы, которые состоят из молекул ДНК или РНК (они образуют геном вируса), упакованных в белковый капсид; у некоторых вирусов капсид окружен еще и мембранной оболочкой, основу которой составляет липидный бислой. Строение вирусного генома и способы его репликации у разных вирусов сильно варьируют. Вирус способен размножаться только в клетке-хозяине, используя для этого ее генетические механизмы. Обычно вирусная инфекция завершается лизисом инфицированной клетки и высвобождением потомства вируса. Однако некоторые вирусы могут включаться в хромосому клетки, не вызывая лизиса последней. Здесь вирусные гены (в форме провируса) реплицируются вместе с генами хозяина. Считается, что многие вирусы

возникли в ходе эволюции из плазмид, которые представляют собой самореплицирующиеся молекулы ДНК или РНК, не способные окружать себя белковой оболочкой.

Транспозоны - это нуклеотидные последовательности ДНК, отличающиеся от вирусов тем, что размножаясь только в клетках-хозяевах или в их потомстве, они, подобно плазмидам, не могут покинуть клетку. От плазмид же транспозоны отличаются тем, что они обычно реплицируются лишь в составе хромосомы хозяина, как ее неотъемлемая часть. Некоторые транспозоны, однако, весьма напоминают ретровирусы: они перемещаются в новые участки генома в результате обратной транскрипции промежуточного РНК-соединения. Существуют и транспозоны, способные оказаться в новом участке хромосомы, сохранив свою копию и на прежнем месте. Хотя и вирусы, и транспозоны могут рассматриваться как паразиты, они полезны тем, что вызываемые ими перестройки нуклеотидных последовательностей ДНК нередко играют важную роль в эволюции клеток и организмов.

5.6. Клонирование ДНК и генная инженерия [54]

Открытия, о которых шла речь в этой главе, были порождены стремлением ученых постичь жизнь клеток и основные механизмы наследственности. Однако в последние годы эти фундаментальные знания получили практическое применение. Методы клонирования ДНК и генная инженерия дают возможность выделять те или иные гены в достаточном количестве, «перекраивать» их по своему усмотрению и затем вновь вводить в какие-нибудь клетки и организмы. Эти методы составляют лишь часть того общего набора методов, который известен как **технология рекомбинантных ДНК** (о нем мы уже говорили в гл. 4). Появление технологии рекомбинантных ДНК вызвало подлинную революцию в науке о живых клетках. Кроме того, оно открыло перед медициной и промышленностью новые пути к получению в достаточном количестве тех белков, которые раньше либо были недоступны вообще, либо могли быть получены лишь в очень малых количествах.

5-48
5-49
5-50

5.6.1. Рестрицирующие нуклеазы облегчают клонирование генов [55]

В 1960-е годы возможность выделить в изолированном виде отдельный ген казалась бесконечно далекой. Ген в клетке в отличие от белка не представляет собой некой дискретной единицы; он есть не что иное, как небольшой участок во много раз большей молекулы ДНК. И хотя механическим воздействием молекулы ДНК в клетке можно разделить на множество сегментов, это разделение происходит по закону случая, и фрагмент, содержащий интересующий нас ген может затеряться среди миллиона других фрагментов. Как получить нужный ген в очищенном виде? Поскольку все молекулы ДНК состоят из одних и тех же четырех видов нуклеотидов, которые входят в их состав примерно в равных пропорциях, их нельзя легко разделить подобно тому, как это делают с белками, на основе различий в их зарядах или по их способности связываться с теми или иными реагентами (см. разд. 4.4.3). Более того, если бы даже какую-нибудь схему очистки и можно было предложить, понадобилось бы очень много ДНК для того, чтобы получить нужный ген в количестве, достаточном для последующих экспериментов. Решение всех этих проблем стало реальным, когда были открыты

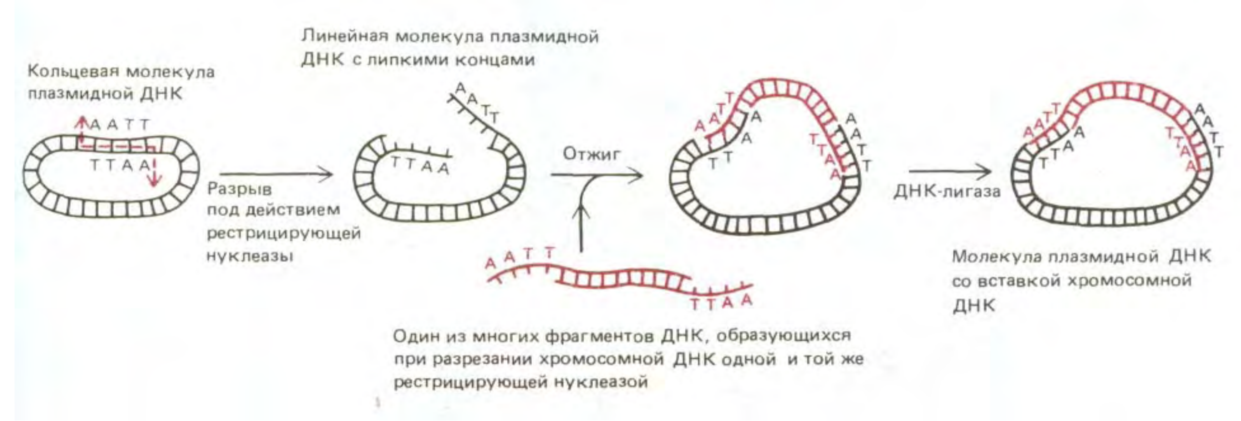


Рис. 5-78. Липкие концы, образующиеся под действием многих рестрицирующих нуклеаз (см. рис. 4-63), обеспечивают возможность соединения двух фрагментов ДНК за счет комплементарных взаимодействий. Фрагменты ДНК, соединившиеся таким путем, связываются затем ковалентно в высокоэффективной реакции, катализируемой ДНК-лигазой. Здесь представлен случай образования рекомбинантной молекулы ДНК, состоящей из плазмиды и встроенной в нее хромосомной ДНК.

ферменты, названные **рестрицирующими нуклеазами (рестриктазами).** Эти ферменты, которые можно выделить в очищенном виде из бактериальных клеток, разрезают двойную спираль ДНК по специфическим последовательностям из 4-8 нуклеотидов, разделяя ее на фрагменты строго определенного размера (их называют *рестрикционными фрагментами).* Специфичность рестрицирующих нуклеаз в отношении нуклеотидных последовательностей у разных видов бактерий различна, так что не очень трудно подобрать такую рестриктазу, которая вырежет небольшой фрагмент ДНК, содержащий определенный ген. Размер этого рестрикционного фрагмента и послужит затем ориентиром для частичной очистки данного гена (выделения его из смеси).

Еще одно свойство рестрицирующих нуклеаз делает их удобным инструментом для клонирования генов. Многие из них вызывают ступенчатые разрывы, вследствие чего на обоих концах фрагмента ДНК образуются короткие одноцепочечные «хвосты». Их называют *липкими концами,* потому что они способны к комплементарному взаимодействию с любым другим концом, образовавшимся под действием того же фермента. Благодаря липким концам, образуемым рестрицирующей нуклеазой, два фрагмента двойной спирали ДНК, происходящие из разных геномов, могут соединиться в одно целое путем спаривания оснований (рис. 5-78). Можно, например, присоединить in vitro фрагмент ДНК, содержащий какой-нибудь ген человека, к хромосоме вируса бактерий и полученную таким путем новую *рекомбинантную молекулу ДНК* ввести затем в бактериальную клетку. Начав с одной этой рекомбинантной молекулы ДНК, инфицировавшей одну бактериальную клетку, репликационная машина вируса может менее чем за сутки выработать свыше 10^{12} идентичных молекул вирусной ДНК, а значит, точно в такой же мере размножить и присоединенный к ней фрагмент ДНК человека. Вирус, используемый для подобной цели, называют клонирующим вектором.

5-51

5.6.2. Получение библиотеки ДНК с помощью вирусных или плазмидных векторов [56]

Клонирование того или иного гена начинается с создания библиотеки ДНК в вирусном или плазмидном векторе. Принципы, лежащие в основе клонирования генов, для обоих этих типов векторов одинаковы, хотя в деталях методы могут и различаться. Ради простоты мы в этой главе пренебрежем различиями и проиллюстрируем методы, о которых идет речь, применительно к плазмидам.

Плазмидные векторы, используемые при клонировании генов, пред-



Рис. 5-79. Очистка и амплификация специфической последовательности ДНК путем клонирования ДНК в бактериальных клетках.

ставляют собой небольшие кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК, происходящие от более крупных плазмид, обычно присутствующих в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих (см. разд. 5.5.11). Как правило, они составляют лишь небольшую фракцию всей ДНК клетки-хозяина, однако благодаря малым размерам их можно легко отделить от молекул хромосомной ДНК, которые, будучи более крупными, при центрифугировании оказываются на дне пробирки. Клонирование начинают с того, что очищенные кольцевые молекулы плазмидной ДНК обрабатывают одной из рестриказ и получают таким путем линейные молекулы ДНК. Затем клеточную ДНК, из которой требуется создать библиотеку, разрезают при помощи той же рестриктазы и полученные рестрикционные фрагменты (включая и те, в которых присутствует клонируемый ген) добавляют к разрезанным плазмидам, а затем подвергают отжигу, для того чтобы могли образоваться рекомбинантные кольцевые молекулы ДНК. Ковалентное сшивание под действием ДНК-лигазы завершает образование этих рекомбинантных молекул, содержащих вставки чужеродной ДНК (см. рис. 5-78).

Следующий шаг к получению библиотеки ДНК состоит в том, что рекомбинантные кольцевые молекулы ДНК вводят в клетки (обычно бактериальные или дрожжевые), сделав их для этой цели временно проницаемыми для ДНК; клетки, как принято говорить, *трансфицируют плазмидами.* Теперь, когда эти клетки растут и делятся, рекомбинантные плазмиды также реплицируются, в результате чего получается в конце концов огромное количество копий кольцевых молекул, содержащих чужеродную ДНК (рис. 5-79). Многие бактериальные плазмиды несут в себе гены устойчивости к антибиотикам. Это их свойство можно использовать для того, чтобы отделить трансфицированные клетки от тех, которые остались нетрансфицированными: если выращивать бактерии в присутствии антибиотика, то выживут и образуют колонии только те клетки, которые содержат плазмиды. Эти выжившие клетки и заключают в себе библиотеку ДНК. Однако лишь немногие из них несут те рекомбинантные плазмиды, в которых находится подлежащий выделению ген. Надо уметь их идентифицировать, чтобы получить интересующую нас ДНК в очищенном виде и в достаточном количестве. Прежде чем говорить о том, каким способом можно этого достичь, нам следует описать и другой путь получения библиотеки ДНК, также используемый при клонировании.

5.6.3. Два типа библиотек ДНК используются для разных целей [57]

Описанное выше в качестве одного из этапов клонирования разрезание генома на фрагменты с помощью рестрицирующей нуклеазы называют иногда «методом дробовика» *(шотган-клонирование).* Фрагменты ДНК образуются при этом в огромном количестве - до миллиона, если речь идет о геноме млекопитающих, а это значит, что и число различных колоний трансфицированных клеток также должно достигать миллионов. Каждая такая колония представляет собой клон, т. е. совокупность потомков одной клетки-родоначальницы, и рекомбинантная плазмида в любой клетке клона несет одну и ту же включенную в нее нуклеотидную последовательность геномной ДНК. Плазмиды одной колонии содержат **клон геномной ДНК,** а вся совокупность плазмид вмещает **библиотеку геномной ДНК.** Однако, поскольку разрезание геномной ДНК на фрагменты определяется случаем, лишь некоторые образовавшиеся фрагменты содержат полноценные гены; во многие из них попадает только часть какого-нибудь гена, а в большинстве клонов геномной ДНК, полученных из ДНК высших эукариотических клеток,

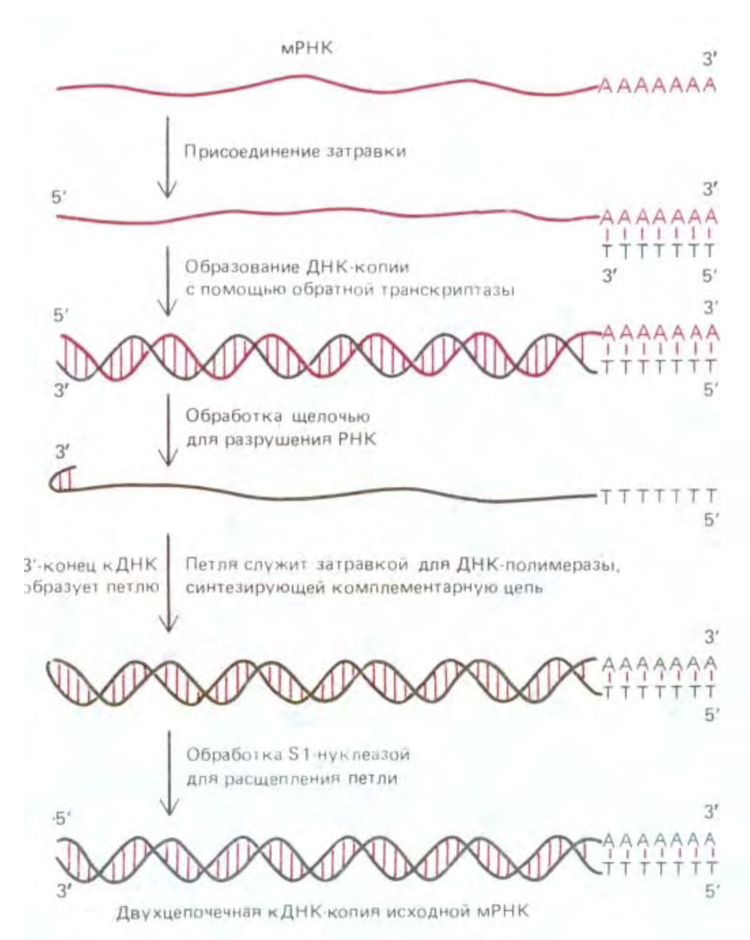


Рис. 5-80. Синтез кДНК. Обратная транскриптаза синтезирует ДНК-копию (кДНК) молекулы мРНК, образуя таким путем гибридную спираль ДНК/РНК. Под действием щелочи РНК-цепь этой гибридной спирали распадается на отдельные нуклеотиды, после чего оставшаяся одноцепочечная кДНК копируется ДНК-полимеразой с образованием двухцепочечной кДНК. Как видно из схемы, для начала синтеза обоим ферментам необходима затравка. Для обратной транскриптазы затравкой служит небольшой олигонуклеотид, в данном случае к длинной последовательности polyA, имеющейся на 3'-конце почти всех мРНК, присоединяется oligo(dT).

Отметим, что у образовавшейся здесь двухцепочечной молекулы кДНК отсутствуют липкие концы; такие молекулы ДНК, с «тупыми» концами, можно клонировать при помощи нескольких процедур, сходных с той, какая представлена на рис. 5-78, хотя и менее эффективно. Можно, например, пришить к концам кДНК синтетические олигонуклеотиды, содержащие участки, в которых рестрицирующий фермент вызывает разрыв, или присоединить ферментативным путем к концам молекулы кДНК одноцепочечные «хвосты», чтобы облегчить включение этой молекулы в клонирующий вектор присутствует лишь некодирующая ДНК, составляющая, как известно, большую часть массы такого генома (см. разд. 9.1.3).

Альтернативный метод начинает процесс клонирования с отбора тех последовательностей ДНК, которые транскрибируются в РНК и, значит, предположительно соответствуют генам. Осуществляется это путем извлечения из клеток мРНК (или очищенной субфракции мРНК) и затем получения комплементарной ДНК-копии (кДНК) каждой наличной молекулы мРНК; эта реакция катализируется обратной транскриптазой-ферментом ретровирусов, синтезирующим цепь ДНК на РНК-матрице (см. разд. 5.5.8). Одноцепочечные молекулы ДНК, синтезированные обратной транскриптазой, превращаются в двухцепочечные молекулы ДНК под действием ДНК-полимеразы, а эти двухцепочечные молекулы включаются в плазмиды и образуют клоны (рис. 5-80). Каждый полученный таким путем клон называется клоном кДНК, а вся совокупность клонов, происходящих от одного препарата мРНК, составляет библиотеку кДНК.

Как видно из рис. 5-81, клоны геномной ДНК и клоны кДНК существенным образом различаются. Геномные клоны представляют собой случайную выборку из всех нуклеотидных последовательностей ДНК данного организма. Состав геномной библиотеки не зависит от того, какой тип клеток был выбран для ее получения. В отличие от этого клоны кДНК содержат лишь те участки генома, которые транскрибируются в мРНК, а так как в клетках разных тканей наборы синтезируемых молекул мРНК различны, то и библиотеки кДНК различны для разных типов клеток, используемых при их конструировании.

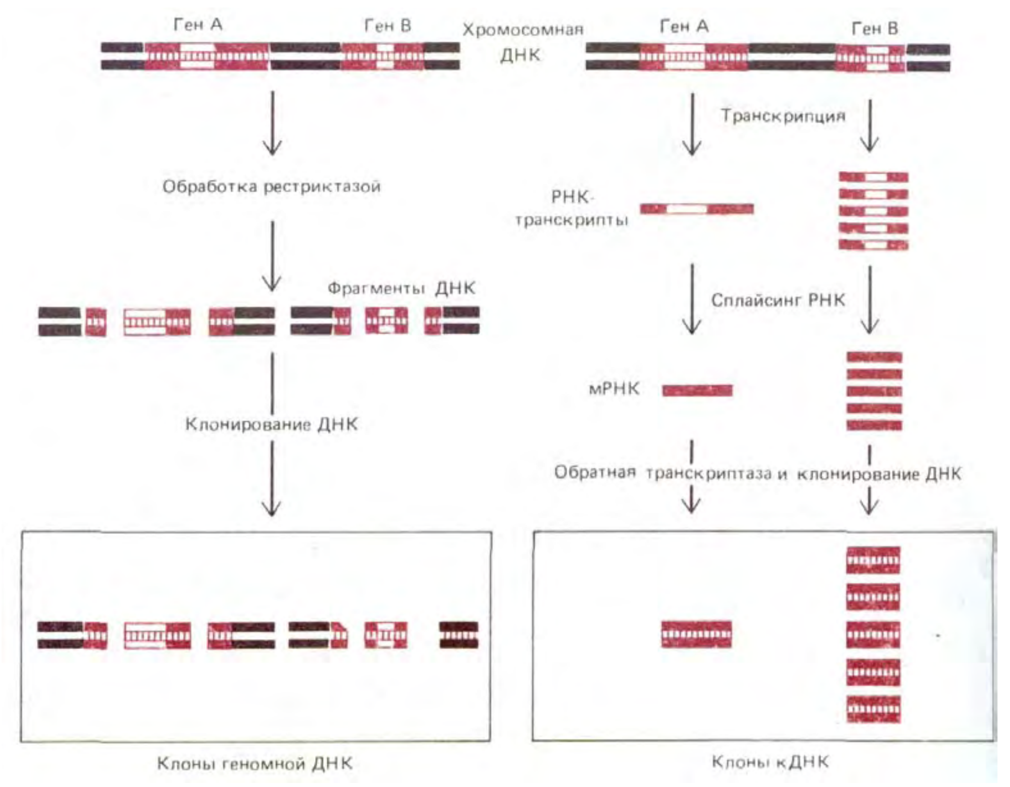


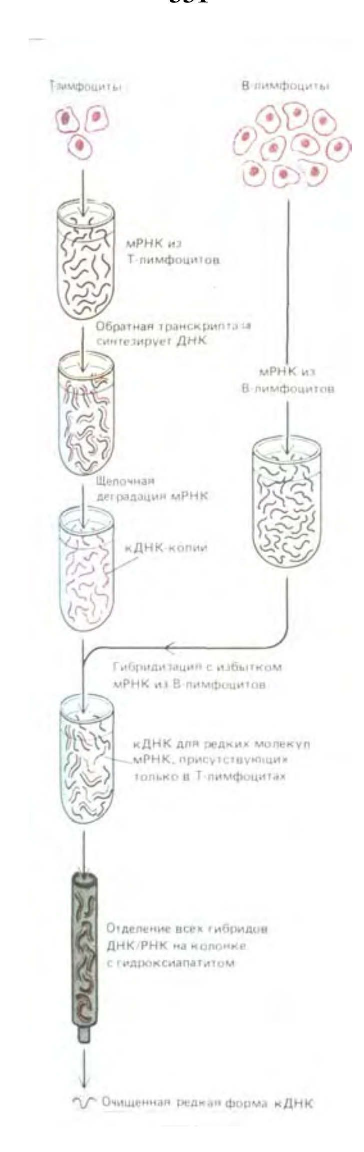
Рис. 5-81. Схема, иллюстрирующая различия между клонами кДНК и клонами геномной ДНК. В этом примере ген А транскрибируется редко, а ген В - часто. Оба типа РНК-транскриптов подвергаются процессингу путем сплайсинга, в результате чего при образовании мРНК удаляется единственный представленный здесь интрон. Большинство генов содержит много интронов (см. табл. 9-1).

Клонирование генов на основе библиотек кДНК имеет ряд преимуществ. Первое из них связано с тем, что многие белки вырабатываются специализированными клетками в очень больших количествах, а значит, в избытке синтезируется и мРНК, кодирующая подобный белок. Библиотека кДНК для таких клеток, естественно, обогащена молекулами кДНК, кодирующей данный белок (рис. 5-81). Это обилие именно нужных молекул кДНК сильно облегчает задачу распознавания требуемого клона в библиотеке. Гемоглобин, например, синтезируется в больших количествах в развивающихся эритроцитах, и как раз по этой причине в числе первых подвергнутых клонированию генов были гены глобина.

Другое преимущество клонов кДНК заключается в том, что в них кодирующая нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается. Эукариотические гены, как известно, состоят из кодирующих последовательностей ДНК, разделенных некодирующими, так что синтез мРНК на таких генах должен сопровождаться удалением из исходного РНК-транскрипта некодирующих (интронных) участков и *сплайсингом* (сращиванием) остающихся фрагментов, т. е. кодирующих последовательностей. Ни бактериальные, ни дрожжевые клетки не способны осуществить такую модификацию РНК, образовавшейся путем транскрипции гена высшей эукариотической клетки. Поэтому, если цель клонирования состоит в определении аминокислотной последовательности белка по данной ДНК или в получении больших количеств белка путем экспрессии клонированного гена в бактериальной или дрожжевой клетке, то начинать предпочтительнее именно с кДНК.

Библиотеки геномной ДНК и к ДНК - неисчерпаемый источник для соответствующих работ и исследователи часто пользуются ими сообща; неуклонно растет также и число таких библиотек, поставляемых специализированными фирмами.

Рис. 5-82. Применение субтрактивной гибридизации для очистки тех редких клонов кДНК, которые соответствуют молекулам мРНК, имеющимся в Т-лимфоцитах, но отсутствующих в В-лимфоцитах. Поскольку два этих типа клеток очень сходны, большая часть мРНК должна быть свойственна как тому, так и другому типу. Данная процедура, таким образом, представляет собой очень эффективный способ обогащения теми специализированными молекулами, по которым два этих типа клеток отличаются друг от друга. →



10-5

5.6.4. Библиотеки кДНК могут быть получены из отобранных популяций молекул мРНК [58]

Если кДНК получают из клеток, в которых уровень экспрессии интересующего нас гена очень высок, то большинство клонов кДНК содержит нуклеотидную последовательность этого гена, и, значит, отбор его не представляет трудностей. Для генов, транскрибируемых не столь интенсивно, необходимы какие-то приемы, которые позволили бы обогатить имеющуюся смесь молекул мРНК нужным ее видом и лишь после этого приступать к получению библиотеки кДНК. Если, например, в нашем распоряжении имеются антитела к данному белку, то ими можно воспользоваться для избирательного осаждения тех изолированных полирибосом, которые содержат его растущие полипептидные цепи. В этих рибосомах будет находиться также и мРНК, кодирующая данный белок, вследствие чего преципитат может быть обогащен интересующей нас мРНК иногда в 1000 раз.

Субтрактивная гибридизация представляет собой еще один высокоэффективный метод для обогащения смеси молекул определенными нуклеотидными последовательностями перед клонированием кДНК. Эту процедуру отбора можно использовать, например, в том случае, если имеются два типа клеток от одного и того же вида организма, очень близких, но отличающихся тем, что лишь один из них продуцирует интересующий нас белок (или белки). Впервые этот метод был применен для идентификации рецепторных белков, имеющихся на поверхности у Т-лимфоцитов, но отсутствующих у В-лимфоцитов. Его можно использовать и в том случае, если у клетки, вырабатывающей определенный белок, имеется мутантный двойник, лишенный такой способности. На первом этапе требуется осуществить синтез кДНК, используя для этого мРНК из того типа клеток, который вырабатывает нужный белок. Затем проводят гибридизацию этих кДНК с молекулами мРНК из клеток второго типа, добавленными в большом избытке. При этом небольшая часть нуклеотидных последовательностей кДНК не находит себе партнера, т.е. комплементарной последовательности мРНК. Очевидно, что именно эти немногие последовательности кДНК соответствуют последовательностям мРНК, имеющимся только у клеток первого типа. Их можно подвергнуть очистке, воспользовавшись для этого простой биохимической процедурой, дающей возможность отделить одноцепочечные нуклеиновые кислоты от двухцепочечных (рис. 5-82). Библиотеки кДНК, полученные путем субтрактивной гибридизации, удобны не только для клонирования тех генов, продукты которых приурочены к определенному типу дифференцированных клеток; они позволяют также определять различия в экспрессии генов между любыми двумя близкими типами клеток.

5-52

5.6.5. Для выявления нужных клонов в генной библиотеке можно использовать гибридизацию с радиоактивным ДНК-зондом [59]

При клонировании генов самой трудной задачей является распознавание в библиотеке тех редких колоний, которые содержат интересующий нас фрагмент ДНК. Это особенно справедливо в отношении геномной библиотеки, так как здесь, для того чтобы выделить нужный ген млекопитающего, приходится среди миллиона клеток разыскивать какую-нибудь одну. Чаще всего для этой цели пользуются особой формой *гибридизации in situ,* основанной на высокой специфичности

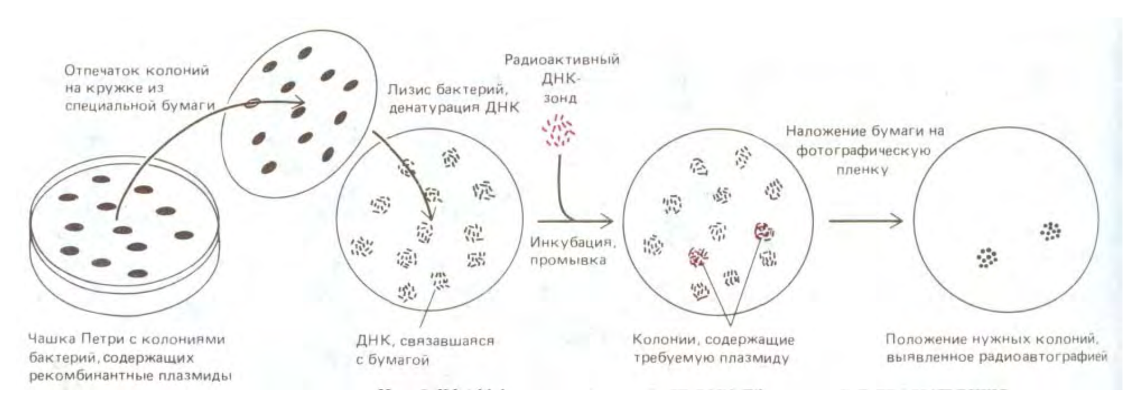


Рис. 5-83. Эффективный метод, широко применяемый для выявления бактериальной колонии, содержащей определенный клон ДНК (см. также рис. 5-79). Каждая бактериальная клетка, несущая рекомбинантную плазмиду, дает начало колонии из идентичных клеток, которая на питательном агаре выглядит как белое пятнышко. Прижимая к поверхности чашки кружок из фильтровальной бумаги, получают реплику бактериальной культуры. Эту реплику обрабатывают щелочью, чтобы разрушить прилипшие к бумаге клетки и денатурировать плазмидную ДНК, а затем проводят гибридизацию с высокорадиоактивным ДНК-зондом. Колонии бактерий, связавшие ДНК-зонд, выявляют методом радиоавтографии.

комплементарных взаимодействий между двумя комплементарными молекулами нуклеиновых кислот. Растущие на чашках колонии бактерий промакивают куском фильтровальной бумаги. При этом часть клеток от каждой колонии прилипает к бумаге. Это прилипшие колонии - их называют *репликами* - обрабатывают щелочью, а затем инкубируют с радиоактивным ДНК-зондом, содержащим часть нуклеотидной последовательности искомого гена (рис. 5-83). При необходимости такому

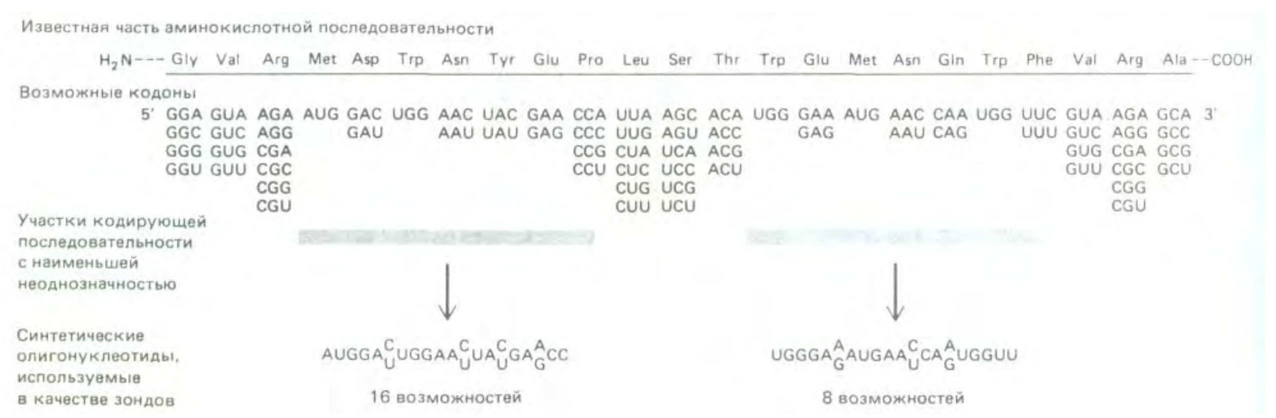


Рис. 5-84. Выбор участков с известной аминокислотной последовательностью для приготовления синтетических олигонуклеотидных зондов. В действительности кодирует данный белок только одна какая-то нуклеотидная последовательность. Однако вследствие вырожденности генетического кода несколько разных нуклеотидных последовательностей могут дать одну и ту же аминокислотную последовательность, так что нельзя заранее сказать, какая из них окажется правильной. Желательно, чтобы в смеси олигонуклеотидов, используемых в качестве зонда, правильная нуклеотидная последовательность составляла наибольшую фракцию, поэтому выбирают участки, для которых число возможностей минимально, как это видно на рисунке. После того как смесь олигонуклеотидов будет синтезирована химическим путем, 5'-конец каждого олигонуклеотида метят радиоактивной меткой (см. рис. 4-65, *Б)*.

скринингу можно подвергнуть миллионы бактериальных клонов, для того чтобы выявить тот клон, который способен к гибридизации с данным зондом.

Способ получения специфического ДНК-зонда зависит от той информации, которой мы располагаем в отношении клонируемого гена. Во многих случаях интересующий нас белок можно идентифицировать химическими методами и выделить хотя бы в малых количествах в очищенном виде. Нескольких микрограмм чистого белка достаточно для того, чтобы определить последовательность первых трех десятков аминокислот в его молекуле. Из этой аминокислотной последовательности на основе генетического кода можно вывести соответствующую нуклеотидную последовательность. Получив эти данные, синтезируют химическим путем два набора олигонуклеотидов ДНК, каждый длиной приблизительно 20 нуклеотидов, и вводят в них радиоактивную метку. Два набора используют в расчете обеспечить соответствие двум разным участкам предсказанной нуклеотидной последовательности клонируемого гена (рис. 5-84). Колонии клеток, обнаружившие способность к гибридизации с обоими наборами ДНК-зондов, скорее всего содержат требуемый ген; поэтому именно их сохраняют для дальнейшего исследования (см. ниже).

5.6.6. Выделение перекрывающихся клонов ДНК («прогулка по хромосоме») позволяет идентифицировать ген, находящийся по соседству с тем, который уже клонирован [60]

Многие гены из числа тех, что представляют наибольший интерес (например гены, регулирующие развитие), известны нам только из генетического анализа мутантов у таких организмов, как плодовая мушка *Drosophila* или нематода *C. elegans*. Белковые продукты этих генов не выделены; возможно, что они присутствуют лишь на какой-то определенной стадии развития. Тем не менее, изучая генетическое сцепление различных мутаций, можно составлять хромосомные карты, дающие представление об относительном расположении этих генов. Если один из картированных таким образом генов удалось клонировать, то клоны в библиотеке геномной ДНК, соответствующие соседним генам, можно идентифицировать при помощи методики, известной как **«прогулка по хромосоме».** Для этого используют две разные библиотеки геномной ДНК, полученные из одной и той же ДНК путем разделения ее на фрагменты двумя разными рестрицирующими нуклеазами. Рис. 5-85 показывает, как клон одной из библиотек может служить ДНК-зондом для выявления перекрывающегося клона другой библиотеки. Из этого нового клона получают затем ДНК-зонд, используемый для нахождения другого перекрывающегося клона в первой библиотеке, и т.д. Таким путем, отыскивая клон за клоном, можно продвигаться по хромосоме всякий раз на расстояние порядка 30000 пар нуклеотидов и более. Как узнать, однако, когда мы, наконец, дойдем до интересующего нас гена (идентифицированного изначально по какой-нибудь вредной мутации)? Обычный прием состоит в том, чтобы непрерывно сравнивать размеры рестрикционных фрагментов ДНК мутантных и нормальных хромосом посредством **блот-анализа по Саузерну,** используя в процессе «прогулки» в качестве зонда каждый новый клон. Некоторые из мутантов возникают вследствие небольших делеций или, наоборот, вставок последовательностей ДНК в соответствующем гене, и определить такие нарушения, как правило, бывает нетрудно. Известно, например, что среди вредных мутаций, затрагивающих типичный ген человека, примерно одна из десяти представляет собой делецию, легко обнаруживаемую блот-ана-

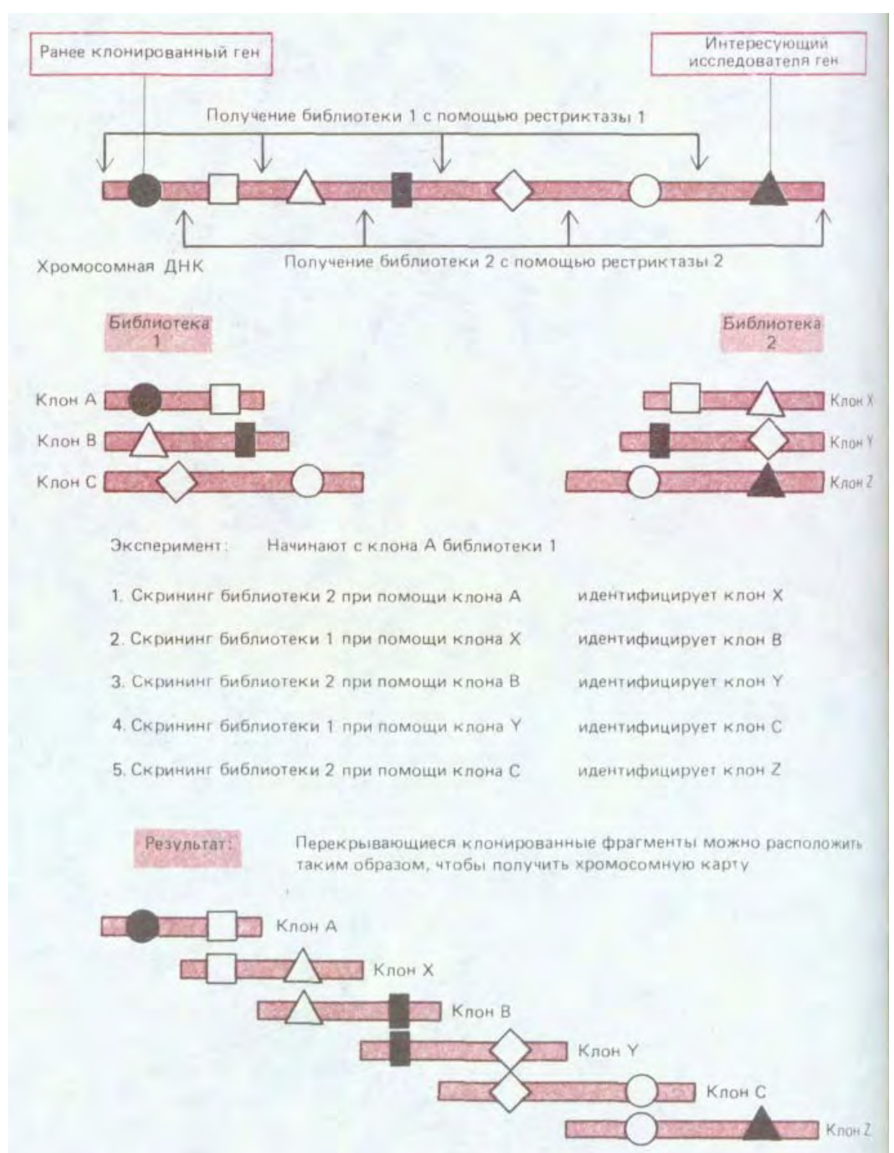


Рис. 5-85. Использование перекрывающихся фрагментов для картирования интересующего нас гена путем «прогулки по хромосоме». Для того чтобы сократить время «прогулки», наиболее пригодны геномные библиотеки, содержащие очень крупные клонированные молекулы ДНК. Зондом для каждого следующего клона служит короткий ^{32}P-фрагмент ДНК одного из концов предыдущего идентифицированного клона. Если, например, используется «правый» конец, то и перемещение происходит «вправо», как в случае, представленном на этом рисунке. Короткий концевой фрагмент удобен в качестве зонда еще и потому, что это снижает вероятность присутствия в зонде повторяющейся последовательности ДНК, которая могла бы гибридизоваться со многими клонами из разных частей генома и тем самым прервать «прогулку».

лизом по Саузерну. Число выявленных таким путем молекулярных дефектов, ответственных за наследственные болезни человека, в последнее время непрерывно растет.

С помощью сходных методов можно расположить в правильном порядке (картировать) в хромосомах *C. elegans* почти весь набор крупных геномных клонов. Такие крупные клоны, каждый примерно по 30000 п.н., вводят в специальные векторы, приготовленные на основе фага λ, так называемые *космиды,* пригодные для включения больших вставок ДНК. Нескольких тысяч космидных клонов достаточно для того, чтобы охватить весь геном такого организма, как C. *elegans* или *Drosophila,* а чтобы картировать таким способом геном человека, необходимо более 100000 космидных клонов. Эта процедура заняла бы, конечно, очень много времени, но технически она выполнима. Кроме того, фрагменты ДНК человека, в 10 раз более крупные, чем космидные клоны (300000 п. н.), можно клонировать, как искусственные хромосомы в дрожжевых клетках; в принципе геном человека можно было бы картировать с помощью 10000 клонов такого типа (см. рис. 9-5).

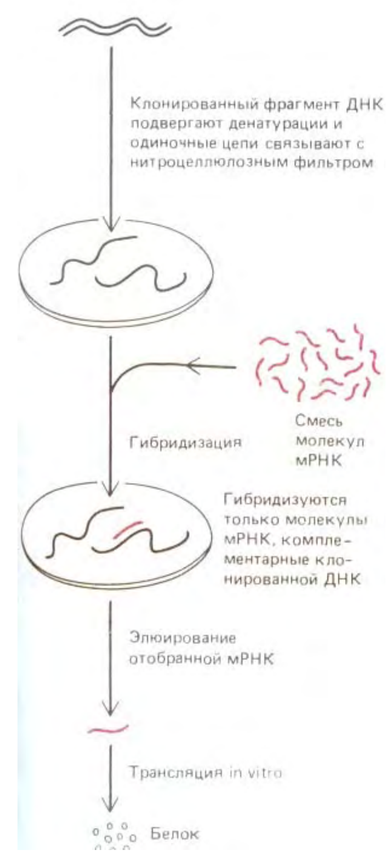


Рис. 5-86. Методика гибридизационной селекции. Молекулы очищенной мРНК элюируются с фильтра в условиях, вызывающих разделение РНК-ДНК-спирали на одиночные цепи.

В недалеком будущем исследователи, несомненно, получат возможность приобретать систематизированные наборы геномных клонов в специальных центрах, располагающих библиотеками ДНК. Там можно будет получить полную библиотеку для всякого обычного объекта исследования с указанием в каталогах для каждой вставки ДНК как хромосомы, из которой она взята, так и ее порядкового номера относительно всех других фрагментов ДНК, происходящих из той же хромосомы. Тогда начать «прогулку по хромосоме» можно будет просто, получив из библиотеки все клоны, охватывающие тот ее участок, в котором содержится интересующий исследователя мутантный ген. Эти клоны послужат затем для приготовления ДНК-зондов, которые позволят точно локализовать измененный ген. В конце концов таким путем удастся выделить многие из мутантных генов, обусловливающих наследственные заболевания у человека.

5.6.7. Трансляция in vitro облегчает идентификацию надлежащего клона ДНК [61]

Выделение клонов геномной ДНК и кДНК методом гибридизации in situ при всей своей эффективности не вполне удобно тем, что в таких экспериментах отбирается обычно немало и «псевдоположительных» клонов. Требуются дополнительные приемы для того, чтобы отличить их от подлинных. Задача облегчается, если требуемый клон кодирует какой-нибудь белок, ранее уже охарактеризованный иными методами. В этом случае каждый подлежащий проверке клонированный фрагмент ДНК используют для отбора комплементарных ему молекул мРНК из смеси клеточных мРНК посредством процесса, называемого гибридизационной селекцией; при этом избыток данного фрагмента ДНК расщепляют на одиночные цепи, иммобилизуют на фильтре и наносят на этот фильтр смесь мРНК, чтобы отобрать комплементарные молекулы мРНК путем РНК-ДНК-гибридизации (рис. 5-86). Очищенную таким способом мРНК используют затем для синтеза белка в бесклеточной системе, содержащей радиоактивные аминокислоты. Полученный радиоактивный белок исследуют и сравнивают с белковым продуктом, который, согласно ожиданиям, должен быть получен от данного клона. Совпадение их характеристик служит обычно в таком тесте основанием для вывода, что клонируемый фрагмент ДНК кодирует данный белок.

5.6.8. Экспрессирующие векторы могут быть использованы для сверхпродукции белков [62]

Очень часто никаких биохимических данных относительно белка, кодируемого тем или иным клонированным фрагментом ДНК, не имеется. Именно так, например, обстоит дело в тех случаях, когда клон, о котором идет речь, был идентифицирован посредством субтрактивной гибридизации или же в результате «прогулки по хромосоме» до соответствующего мутантного гена. Более того, в таких случаях мРНК, кодирующая этот белок, часто присутствует в столь малых количествах или же в столь немногих клетках, что гибридизационная селекция комплементарной мРНК оказывается неосуществимой. При этом приходится прибегать к другим методам, которые дают возможность охарактеризовать белковый продукт клонированного гена. Один из методов состоит в том, чтобы синтезировать короткий фрагмент белка (олигопептид), соответствующий выведенной аминокислотной последовательности белкового продукта секвенированной молекулы кДНК, а затем получить антитела к этому олигопептиду. Эти антитела во многих случаях будут распознавать ту же аминокислотную последова-

тельность в составе природного белка, что даст возможность обнаруживать, локализовать и подвергать очистке белок, кодируемый исходной кДНК. Такой иммунологический подход в сочетании с клонированием путем субтрактивной гибридизации эффективен и как способ идентификации белков, специфичных для определенного типа клеток, и как путь к изучению характера дифференцировки, а также свойств и функций каждого типа клеток в многоклеточном организме.

Однако самый простой путь, позволяющий охарактеризовать белок, закодированный в какой-нибудь клонированной кДНК, заключается в том, чтобы заставить саму эту кДНК направлять синтез белка в клетке-хозяине. Плазмиды или вирусы выступают в таких случаях в качестве **экспрессирующих векторов;** их конструируют с таким расчетом, чтобы присоединить клонированную кДНК к той последовательности, которая служит сильным промотором для транскрипции. Исследователи располагают достаточно широким набором экспрессирующих векторов - каждый из них приспособлен для функционирования в клетках того типа, в которых должен синтезироваться данный белок. С помощью этого *генноинженерного* подхода клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих можно заставить вырабатывать большие количества различных ценных белков, таких, как гормон роста человека, интерферон или антитела к вирусам, используемые для приготовления вакцин. Особенно удобны для получения белка бактериальные клетки с плазмидными или вирусными векторами, сконструированными подобным образом; встроенный чужеродный ген обеспечивает нередко свыше 10% от всего синтезируемого клеткой белка. Для клетки синтез такого большого количества какого-нибудь белка оказывается часто непомерной метаболической нагрузкой; поэтому предложены особые «индуцибельные» промоторы, с помощью которых запуск транскрипции можно осуществлять лишь за несколько часов до сбора клеток для выделения из них белка. Некоторые плазмидные экспрессирующие векторы содержат, например, промотор, полученный из бактериофага λ. Работа его регулируется температурочувствительным белковым продуктом генарепрессора; повысив температуру бактериальных клеток до 42°С, можно в любой момент «включить» промотор и быстро получить большое количество требуемого белка.

Если библиотека кДНК создана в экспрессирующем векторе, то каждый клон будет продуцировать особый белок и тогда представляющие интерес клоны можно идентифицировать не по их нуклеотидной последовательности, а по их белковым продуктам. При этом в качестве зонда для клонов обычно применяют радиоактивно меченные антитела. Иногда вместо этого можно провести прямой тест, выявляющий биологическую активность продукта данного гена. Особенно эффективен этот метод при поисках эукариотических генов, ответственных за секретируемые факторы роста. Можно, например, клоны кДНК из клеток, вырабатывающих определенный фактор роста, ввести в экспрессирующий вектор, размножающийся в клетках млекопитающих. Смесь трансфицированных клеток, содержащих много таких различных клонов, выращивают на небольшой чашке, где каждая клетка, в которой экспрессируется данный ген, выделяет этот фактор роста в среду. Затем пробы среды испытывают на присутствие данного фактора роста, добавляя их к культурам других клеток, способных реагировать на этот фактор. Тест отличается настолько высокой чувствительностью, что положительный ответ получают даже в том случае, когда в исходной культуре одна клетка из тысячи содержит ген, кодирующий данный фактор роста. Повторное тестирование позволяет отыскать в смеси тот единственный клон, который продуцирует этот фактор. Таким способом удалось открыть ранее неизвестные факторы роста и выделить их за

срок, не превышавший нескольких месяцев; если бы процедуру вели обычными биохимическими методами, то для очистки в миллион с лишним раз потребовалась бы чрезвычайно кропотливая работа, которая длилась бы годы.

5-53

5.6.9. Гены можно «перестраивать» и таким путем получать белки с желаемой аминокислотной последовательностью [63]

Перестраивая кодирующую последовательность и регуляторные участки гена, можно изменять функциональные свойства его белкового продукта, количество синтезируемого белка и, наконец, менять тип клеток, способных вырабатывать данный белок.

В кодирующую последовательность можно вносить весьма существенные изменения, например, можно «пришивать» какую-нибудь ее часть к другому гену, что даст в результате новый гибридный ген, кодирующий *комбинированный (составной) белок* (fusion protein). Подобные белки часто используются для выявления функций различных доменов белковой молекулы. Известно, например, что большинство ядерных белков содержит особые короткие аминокислотные последовательности, которые распознаются как сигнал для немедленного импорта этих белков в клеточное ядро. Присоединяя искусственно - методом **слияния генов -** к какому-нибудь цитоплазматическому белку различные части молекулы ядерных белков, можно идентифицировать эти «сигнальные пептиды», ответственные за импорт в ядро.

Для более тонкой структурной реорганизации гена (результатом которой является замена одной или нескольких аминокислот в кодируемом белке) требуются специальные методы. Сначала химическим путем синтезируют небольшую молекулу ДНК, содержащую измененную часть нуклеотидной последовательности данного гена. Затем этот синтетический олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечной плазмидой ДНК, в составе которой присутствует последовательность ДНК, подлежащая изменению; гибридизацию ведут в условиях, допускающих спаривание не вполне подходящих партнеров (рис. 5-87). Синтетический олигонуклеотид становится затравкой для ДНК-полимеразы, осуществляющей синтез ДНК, в результате которого образуется молекула, содержащая ген с встроенной в него измененной последовательностью. После этого модифицированный ген включают в экспрессирующий вектор, что позволяет получить измененный белок в достаточном количестве для детального изучения. Заменяя таким путем те или иные аминокислоты в молекуле интересующего нас белка, можно выяснить, какие именно части полипептидной цепи ответственны за такие фундаментальные процессы, как свертывание белка, взаимодействие белка с лигандом или ферментативный катализ.

В тех случаях, когда требуется определить, какая именно часть эукариотического гена ответственна за регулирование его экспрессии, предполагаемые регуляторные последовательности ДНК этого гена можно присоединить к кодирующей последовательности другого гена, выбранного с таким расчетом, чтобы в нем был закодирован какой-нибудь легко обнаруживаемый фермент-маркер, в норме в эукариотических клетках отсутствующий. Чаще всего в качестве такого фермента-маркера используется бактериальный белок *хлорамфеникол-ацетил-трансфераза (ХАТ).* Полученную рекомбинантную молекулу ДНК вводят в эукариотическую клетку, чтобы выяснить, действительно ли предполагаемые регуляторные последовательности стимулируют экспрессию гена ХАТ. Проще всего сделать это, если трансфицировать

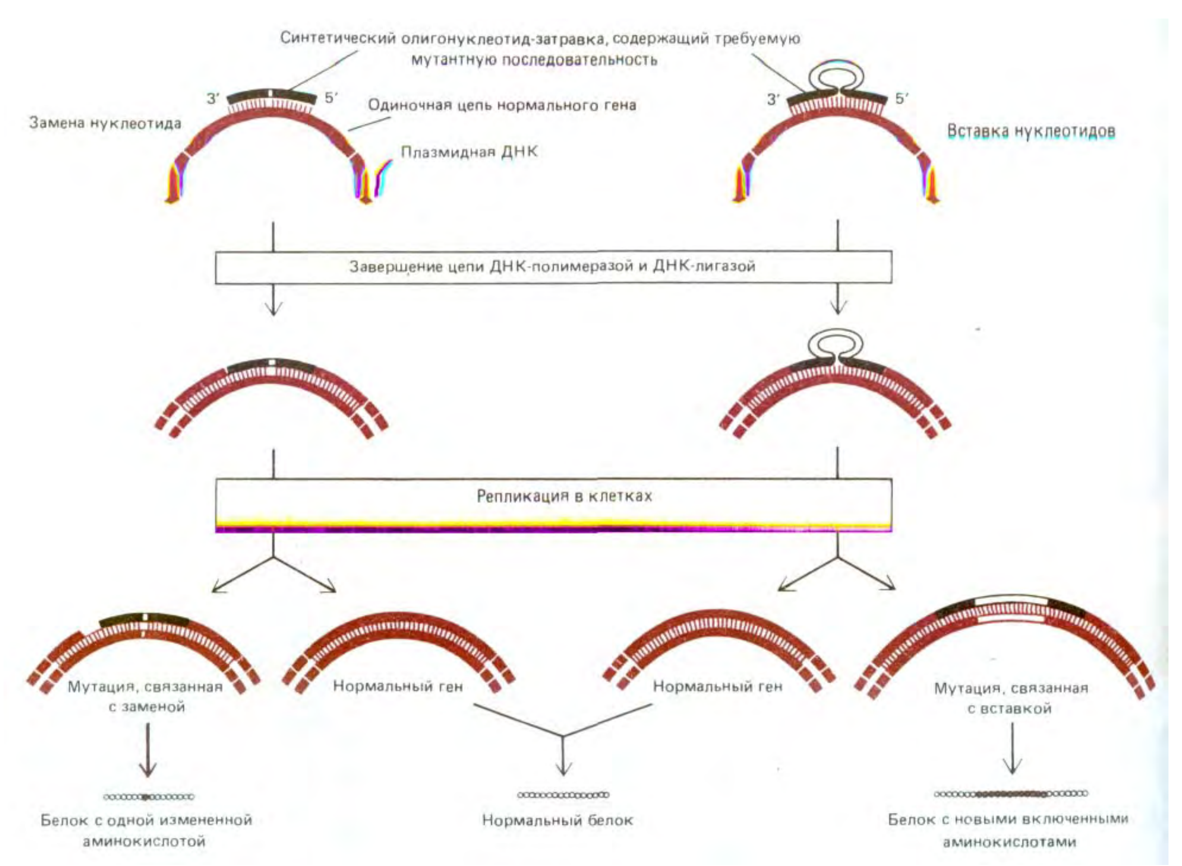


Рис. 5-87. Использование синтетических олигонуклеотидов для изменения отдельных кодирующих участков гена. Здесь приведены лишь два примера из многих возможных типов таких изменений. С помощью подходящего олигонуклеотида можно, например, заменить одновременно не одну, а несколько аминокислот, можно также вызвать выпадение одной или нескольких аминокислот. Из схемы ясно, что при такой процедуре в исходной рекомбинантной плазмиде изменяется только одна из двух цепей ДНК, так что после репликации лишь половина всех трансфицированных клеток содержит плазмиду с нужным мутантным геном. Здесь указана лишь небольшая часть всей плазмидной последовательности.

клетки в культуре и затем после инкубации в течение ночи исследовать их на хлорамфеникол-ацетилтрансферазную активность. Среди трансфицированных клеток многие в течение некоторого времени экспрессируют чужеродный ген, но лишь очень небольшое число клеток удерживает этот ген надолго. Чтобы добиться *устойчивой трансформации,* надо произвести отбор тех редких клеточных клонов, у которых рекомбинантные молекулы ДНК включились в их хромосомы. Трансфицируя различные типы клеток такими рекомбинантными молекулами ДНК, удается определять те регуляторные последовательности ДНК, которые позволяют данному гену экспрессироваться в одних клетках и не экспрессироваться в других (разд. 10.2.8).

5.6.10. Сконструированные гены можно ввести в половые клетки мыши или плодовой мушки и получить трансгенные организмы [64]

Для выявления функции измененного белка, необходимо ввести этот ген в организм и проследить, каков будет эффект. В идеале желательно заменить нормальный ген измененным, с тем чтобы действие мутантного белка можно было наблюдать в условиях, когда нормальный белок отсутствует. Единственный эукариотический организм, с которым такую процедуру можно проделать относительно легко, - это дрожжи. Фрагменты ДНК, введенные в растущие дрожжевые клетки, достаточно эффективно включаются в виде одиночных копий в гомологичные участки хромосом путем общей рекомбинации, так что на место эндогенной копии данного гена становится сконструированный ген. Это

открывает широкие возможности для изучения функций различных генов у дрожжей (см. разд. 4.6.15).

Иначе обстоит дело с клетками млекопитающих. Здесь мы пока не в состоянии установить, как и куда включилась в хромосому введенная в клетку ДНК. В среднем лишь один акт интеграции на тысячу приводит к замене одного гена другим. Вместо этого клеточные ферменты быстро сшивают линейные фрагменты ДНК конец-в-конец и такой длинный тандем обычно включается в хромосому в каких-то, по-видимому, случайных, участках. Оплодотворенные яйца млекопитающих ведут себя в этом отношении так же, как и прочие клетки млекопитающих. Если ввести в яйцо мыши 200 копий линейной молекулы ДНК, то часто из него развивается мышь, у которой в одну из ее хромосом в случайном участке интегрированы эти тандемно повторяющиеся копии введенного гена (рис. 5-88). В том случае, когда модифицированная хромосома присутствует и в половых клетках (яйцеклетках или сперматозоидах), мышь передаст эти новые полученные ею гены своему потомству; животные с таким устойчивым изменением называются **трансгенными.** Поскольку нормальный ген у них, как правило, сохраняется, трансгенные животные по большей части непригодны для столь убедительной, как у дрожжей, демонстрации эффектов, связанных с изменением гена; однако с их помощью были уже получены важные сведения о том, как осуществляется регуляция генов млекопитающих (см. стр. 10.3.11) и каким образом некоторые гены (их называют онкогенами) обусловливают возникновение рака (см. разд. 21.2.5).

Сходные эксперименты можно проводить с плодовой мушкой *Drosophila,* используя для этого методику, дающую возможность включать в геном мухи в каком-либо случайном его участке одну копию любого интересующего нас гена. Главная задача состоит здесь в том, чтобы встроить фрагмент ДНК, о котором идет речь, между двумя концевыми последовательностями определенного мобильного элемента *Drosophila,* так называемого *Р-элемента.* Эти концевые последовательности позволяют Р-элементу включаться в хромосомы *Drosophila,* если в клетке присутствует также особый фермент, катализирующий это включение (Р-элемент-транспозаза; см. разд. 5.5.10). Поэтому, для того чтобы получить трансгенных плодовых мушек, требуется инъецировать соответствующим образом модифицированный фрагмент ДНК в эмбрион мухи на одной из очень ранних стадий развития и одновременно ввести туда же отдельную плазмиду, содержащую ген транспозазы. В этом случае инъецированный ген в виде одиночной копии часто попадает (вследствие транспозиции) в клетки зародышевого пути (рис. 5-88).

Недавно у мышей удалось осуществить замену гена косвенным, достаточно трудоемким путем. Процедура сводится к следующему. Сначала фрагмент ДНК, содержащий нужный мутантный ген, вводят путем трансфекции в специальную линию плюрипотентных стволовых клеток, выделенных из эмбриона и выращиваемых в культуре. Клеткам дают возможность размножаться в течение некоторого времени, после чего методом блот-анализа по Саузерну выявляют редкие колонии, в которых общая рекомбинация привела к замене гена, и отдельные клетки из этих колоний имплантируют в ранний эмбрион мыши. В этой новой для них среде выделенные из эмбриона стволовые клетки часто пролиферируют, образуя крупные участки в теле нормальной мыши. Мышей, у которых произошла замена гена в клетках зародышевого пути, скрещивают, чтобы получить самца и самку, которые окажутся гетерозиготными по этому признаку (т. е. будут иметь одну нормальную и одну мутантную копию данного гена). Если теперь скрестить этих животных, то одна четвертая часть их потомства будет гомозиготной по

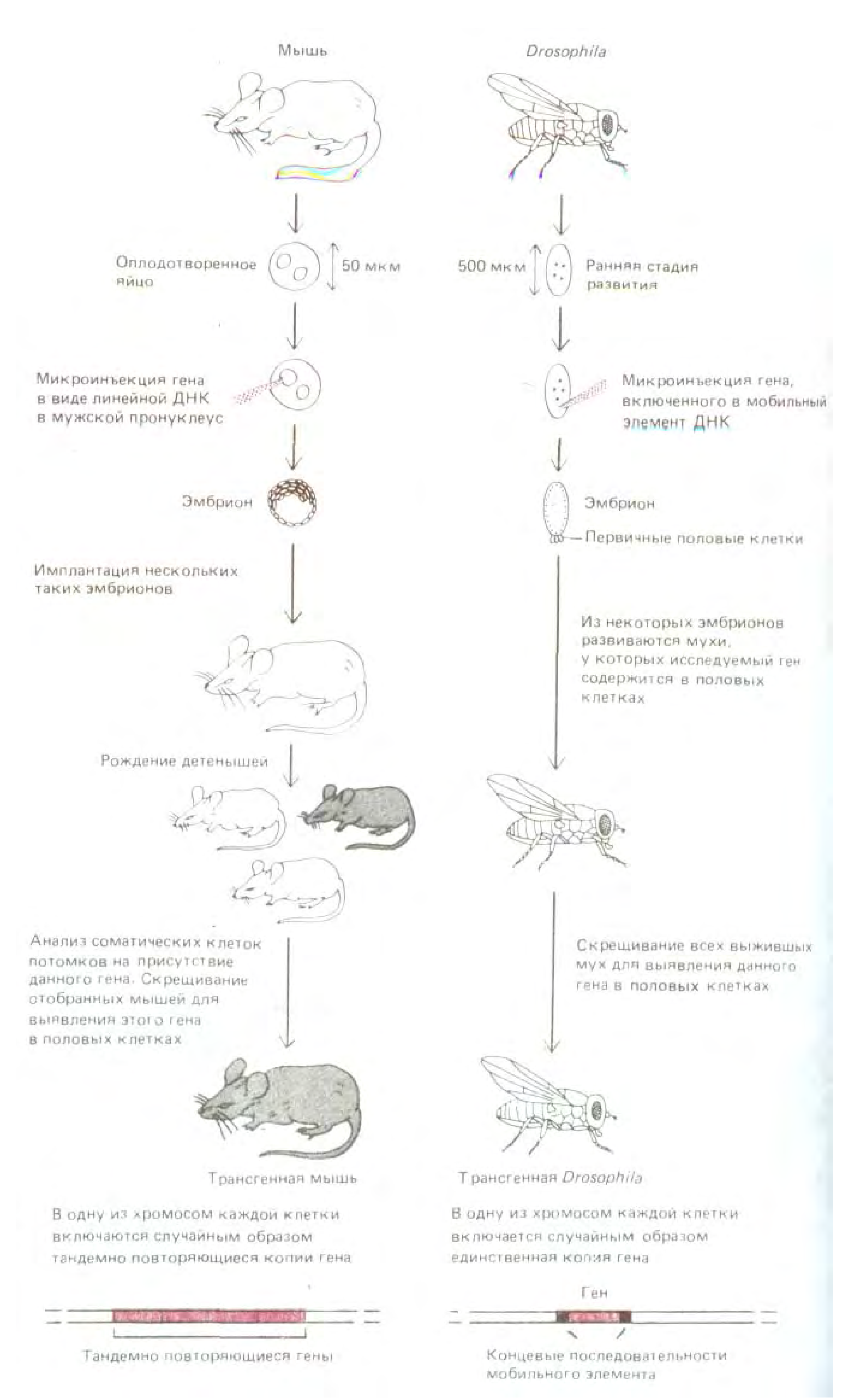


Рис. 5-88. Сравнение стандартных процедур, используемых для получения трансгенной мыши и трансгенной плодовой мушки. В этих примерах ген, введенный в яйцо мыши, вызывает изменение окраски шерсти, а ген, введенный в эмбрион плодовой мушки, - изменение цвета глаз. В обоих случаях у части трансгенных организмов вставки ДНК обнаружены не в одном, а в нескольких участках хромосомы.

измененному гену. Изучение таких гомозигот позволит наблюдать функцию измененного гена в отсутствие его нормального аллеля.

Возможность получения трансгенных мышей и дрозофил дает в руки исследователей новый мощный инструмент для изучения функции генов в интактном организме.

5.6.11. Отобранные сегменты ДНК можно клонировать in vitro посредством полимеразной цепной реакции [65]

Доступность очищенных ДНК-полимераз и химически синтезированных ДНК-олигонуклеотидов сделала возможным быстрое клонирование специфических последовательностей ДНК вне живой клетки. Методика, известная под названием **полимеразной цепной реакции (ПЦР),** позволяет амплифицировать ДНК из какого-нибудь выбранного участка генома более чем в миллион раз, при условии, что нам известна хотя бы часть его нуклеотидной последовательности. Участки этой последовательности, окружающие выбранную для амплификации область, используют для того, чтобы приготовить по ним два синтетических ДНК-олигонуклеотида, каждый из которых комплементарен одной из двух цепей молекулы ДНК. Эти олигонуклеотиды служат затравками при синтезе ДНК in vitro катализируемом ДНК-полимеразой; они определяют концы получаемого фрагмента ДНК (рис. 5-89, *А)*.

Принцип методики ПЦР ясен из рис. 5-89, *Б.* В каждом цикле реакции необходимо сначала кратковременное нагревание ДНК для разделения двух цепей двойной спирали (1-й этап). Последующее охлаждение ДНК в присутствии большого избытка двух упомянутых ДНК-олигонуклеотидов приводит к специфической гибридизации этих олигонуклеотидов с комплементарными последовательностями ДНК (2-й этап). После отжига смесь инкубируют с ДНК-полимеразой и четырьмя дезоксинуклеозидтрифосфатами, в результате чего избирательно синтезируются те участки ДНК, которые располагаются «книзу» от затравки (3-й этап). Для эффективной амплификации ДНК требуется от 20 до 30 циклов реакции. В каждом последующем цикле количество ДНК по сравнению с предыдущим циклом удваивается. Отдельный цикл занимает около 5 мин, поэтому при автоматизации всей процедуры для «бесклеточного молекулярного клонирования» какого-либо фрагмента ДНК требуется несколько часов, тогда как обычные процедуры клонирования растягиваются на несколько дней.

Метод ПЦР отличается чрезвычайно высокой чувствительностью: он позволяет обнаружить в пробе всего одну присутствующую в ней молекулу ДНК. Тот же способ пригоден и для анализа следовых

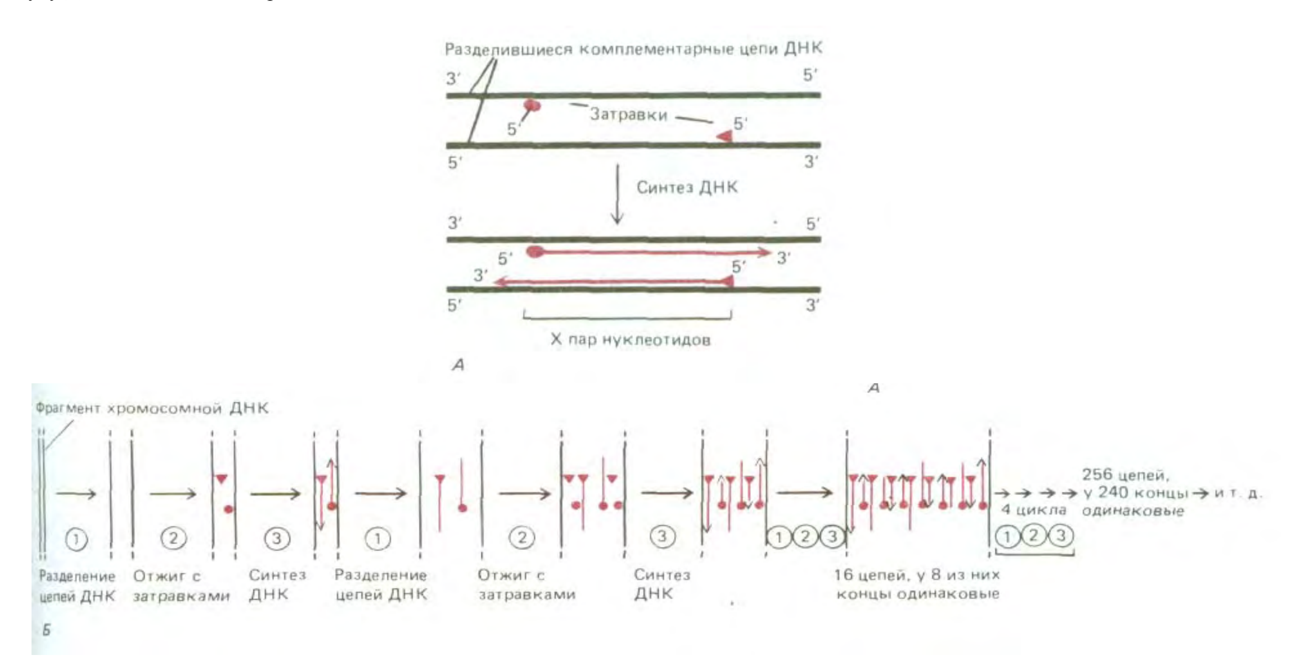


Рис. 5-89. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), используемая для амплификации специфических нуклеотидных последовательностей in vitro *А.* Выделенную из клеток ДНК нагревают, чтобы разделить ее комплементарные цепи. Затем проводят отжиг этих цепей, добавив к ним избыток двух ДНК-олигонуклеотидов (по 15-20 нуклеотидов каждый), синтезированных химически с таким расчетом, чтобы они были комплементарны последовательностям, отделенным друг от друга расстоянием в X нуклеотидов (значение X варьирует от 50 до 2000). Эти два олигонуклеотида служат специфическими затравками для синтеза ДНК in vitro, катализируемого ДНК-полимеразой, которая копирует ДНК между соответствующими последовательностями. Б. Многократное повторение циклов реакции дает в итоге большое количество копий одного фрагмента ДНК (длиной X нуклеотидов).



Рис. 5-90. Выявление полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) блот-анализом по Саузерну. Для простоты в хромосомах показано лишь несколько сайтов рестрикции, хотя в действительности их многие тысячи. Если до воздействия рестрицирующей нуклеазой провести амплификацию соответствующего участка методом ПЦР, этот же тест можно провести без радиоизотопов и от блот-анализа отказаться.

количеств РНК; для этого РНК переводят в последовательности ДНК с помощью обратной транскриптазы (см. разд. 5.6.3). Клонирование методом ПЦР быстро вытесняет блот-анализ по Саузерну в таких областях, как пренатальная диагностика наследственных болезней и выявление вирусных инфекций. Большие перспективы открывает этот метод также и в судебной медицине, поскольку он дает возможность однозначно определить принадлежность одной-единственной клетки данному человеку.

10-31

5.6.12. Применение рекомбинантных ДНК сильно облегчает картирование и анализ крупных геномов [66]

Появившиеся в последнее время методы позволяют составлять подробные карты очень больших геномов. Есть две категории карт: 1. *Физические карты,* основывающиеся на строении молекул ДНК, составляющих каждую хромосому. Сюда относятся рестрикционные карты и систематизированные библиотеки клонов геномной ДНК. 2. *Карты генетического сцепления;* их строят, основываясь на частоте совместной передачи потомству двух или нескольких признаков - генетических маркеров, различных у отца и матери и приписываемых определенному участку хромосомы. В качестве маркеров издавна принято использовать те гены, экспрессия которых обнаруживается по их эффекту (таковы, в частности, гены, вызывающие генетические болезни, например мышечную дистрофию). Разработанные сравнительно недавно новые методы с применением рекомбинантной ДНК дали возможность использовать в качестве генетических маркеров короткие последовательности ДНК, содержащие один из сайтов рестрикции и различающиеся у отдельных индивидуумов; такие последовательности особенно удобны для генетического картирования, потому что под действием рестрикционной нуклеазы возникают фрагменты, различающиеся по своей длине, и этот **полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)** легко может быть выявлен блот-анализом по Саузерну с помощью подходящего ДНК-зонда (рис. 5-90).

Если два генетических маркера находятся в разных хромосомах, то сцепление между ними отсутствует, т. е. шансы на их совместную передачу потомству равны 50:50. То же справедливо и в отношении маркеров, локализующихся на противоположных концах одной и той же хромосомы, из-за большой вероятности их разделения в результате кроссинговера, частота которого в процессе мейоза, при образовании яйцеклеток и сперматозоидов, весьма высока (см. разд. 15.2.3). Чем ближе друг к другу два маркера в пределах одной хромосомы, тем больше вероятность того, что они не будут разделены кроссинговером, а значит, будут переданы потомству совместно. Проведя скрининг больших семейных групп на совместное наследование интересующего нас гена (например, гена, ответственного за какую-нибудь болезнь) и большого числа отдельных ПДРФ-маркеров, можно идентифицировать несколько ПДРФ-маркеров, окружающих данный ген. Таким путем удается локализовать последовательности ДНК, находящиеся поблизости от этого гена, а в конце концов и ДНК, соответствующую самому этому гену (рис. 5-91). Этот метод используется для локализации многих генов, ответственных за болезни человека. После выделения такого гена можно подвергнуть детальному анализу его белковый продукт (см. разд. 4.6.12).

Чтобы облегчить эти и некоторые другие исследования, в настоящее время ведется усиленная работа по созданию детальной ПДРФ-карты генома человека, на которой будут отмечены тысячи маркеров, от-

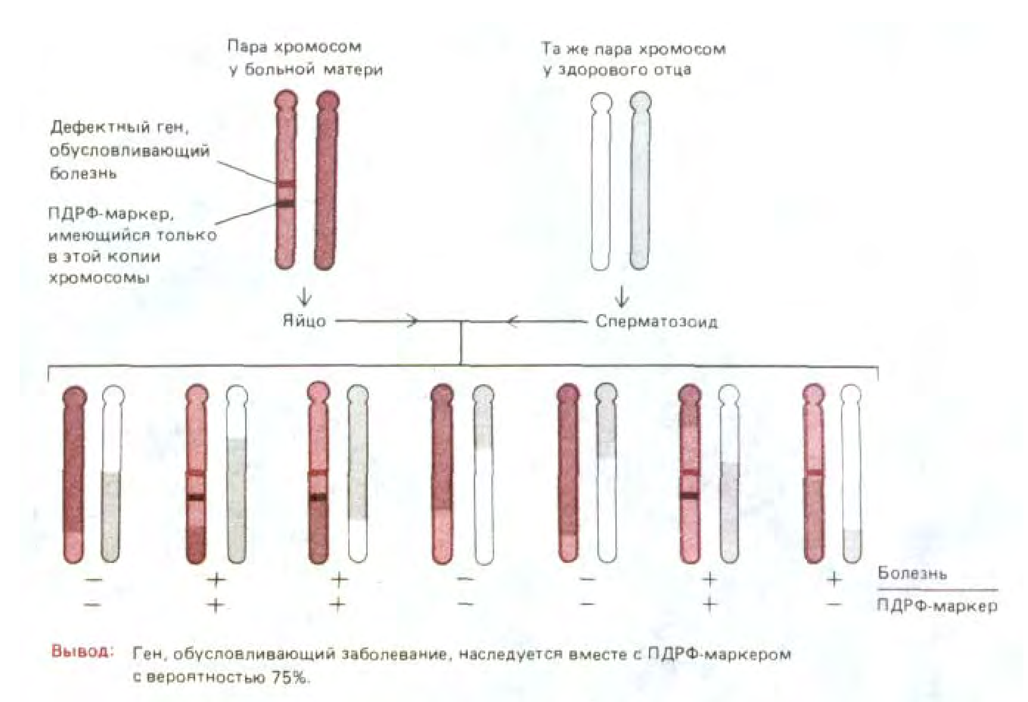


Рис. 5-91. Анализ генетического сцепления выявляет совместную передачу потомству какого-либо гена, обусловливающего у человека специфический фенотип (в данном случае - определенную болезнь), и соседнего ПДРФ-маркера. Такой анализ дает возможность клонировать многие гены человека и исследовать продукты этих генов.

стоящих друг от друга в среднем на 10^6 п. н. (два маркера, разделенные таким расстоянием, наследуются совместно в 99 случаях из 100). Получив в свое распоряжение такую карту, можно будет - на основе данных о генетическом сцеплении - гены, идентифицированные ранее лишь по их эффекту у человека, локализовать в пределах одного или нескольких больших клонов в систематизированной библиотеке геномной ДНК. После этого на выделение данного гена потребуется в большинстве случаев уже не более нескольких месяцев.

Быстрые успехи технологии рекомбинантной ДНК позволят в ближайшее время секвенировать длинные отрезки ДНК при сравнительно небольших затратах. Это значит, что станет возможным секвенирование целых геномов бактерий, дрожжей, нематод и *Drosophila,* а также обширных участков генома различных высших растений и позвоночных животных, в том числе и человека.

Заключение

При клонировании ДНК фрагмент, содержащий изучаемый ген, выявляют обычно с помощью радиоактивного ДНК-зонда или, после экспрессии гена в клетке-хозяине, - с помощью антител, обнаруживающих кодируемый этим геном белок. Затем клеткам, несущим данный фрагмент ДНК, предоставляют возможность размножаться и нарабатывать большое количество копий как самого гена, так и молекул его продукта. Для генноинженерных задач нуклеотидную последовательность такого клонированного фрагмента ДНК изменяют, присоединяют к другой последовательности ДНК, а затем снова вводят в клетки. Сочетание клонирования ДНК с генной инженерией вооружает клеточного биолога очень мощным инструментом исследования. В принципе возможно сконструировать ген, кодирующий белок с любой желательной аминокислотной последовательностью, и присоединить его к такой промоторной последовательности ДНК, которая позволит контролировать время и тип экспрессии гена. Этот новый ген можно ввести либо в клетки, выращиваемые в культуре, либо в клетки зародышевого пути мыши или плодовой мушки. У трансгенных животных эффект экспрессии включенного гена можно наблюдать на многих различных клетках и тканях.

Литература

Общая

Judson И. F. The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology, New York, Simon and Schuster, 1979. (History derived from personal interviews.)

Lewin B. Genes, 3rd ed. New York, Wiley, 1987.

Stent G.S. Molecular Genetics: An Introductory Narrative, San Francisco, Freeman, 1971. (Clear descriptions of the classical experiments.) *Watson J. D., Hopkins N. H.,*

Roberts J. W., Weiner A. M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed.Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings 1987.

Цитируемая

1. *Chamberlin M.* Bacterial DNA-dependent RNA polymerases. In: The Enzymes, 3rd ed., Vol. 15B (P. Boyer ed.), pp. 61-108. New York, Academic Press, 1982.
   McClure W. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes.
   Annu. Rev. Biochem., 54, 171-204, 1985.
   Yager T.D., Hippel P.H. Transcript elongation and termination in *E. coll* In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology (F.C. Niedhardt ed.), pp. 1241-1275. Washington DC, American Society for Microbiology, 1987.
2. *Hawley D. K., McClure W.R.* Compilation and Analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acids Res., 11, 2237-2255, 1983.
   Siebenlist U., Simpson R., Gilbert W. E. coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. Cell, 20, 269-281, 1980.
3. *Rich A., Kim S. H.* The three-dimensional structure of transfer RNA. Sci. Am, 238(1), 52-62, 1978.
   Schimmel P. R., Soll D., Abelson J. N., eds. Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition, and Biological Aspects (2 volumes). Cold Spring Harbor. NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
4. *Schimmel P.* Aminoacyl tRNA synthetase: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. Annu. Rev. Biochem., **56**, 125-158, 1987.
5. *Crick F.H.C.* The genetic code. III. Sci. Am., **21(4)**, 55-62, 1966. The Genetic Code. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. **31**, 1966. (The original experiments that defined the code.)
6. *Moore P. B.* The ribosome returns. Nature, **331**, 223-227, 1988.
   Noller H.F. Structure of ribosomal RNA. Annu. Rev. Biochem., **53,** 119-162, 1984.
   Spirin A. S. Ribosome Structure and Protein Synthesis. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1986.
7. *Clark B.* The elongation step of protein biosynthesis. Trends Biochem. Sci., **5**, 207-210, 1980.
   Watson J. D. The involvement of RNA in the synthesis of proteins. Science, 140, 17-26, 1963. (A description of how ribosome function was initially deciphered.)
8. *Caskey C. T.* Peptide chain termination. Trends Biochem. Sci., **5**, 234-237, 1980. *Cragien W.J., Caskey C. T.* The function, structure and regulation of *E. coli* peptide chain release factors. Biochemie, **69**, 1031-1041, 1987.
9. *Gold L.* Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli.* Annu. Rev. Biochem., **57**, 199-233, 1988.
   Hunt T. The initiation of protein synthesis. Trends Biochem. Sci., **5**, 178-181, 1980. *Pain V.M.* Initiation of protein synthesis in mammalian cells Biochem. J., **235,** 625-637, 1986.
10. *Kozak M.* Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microbiol. Rev., **47**, 1-45, 1983.
    Kozak M. An analysis of 5' noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res., **15,** 8125-8147, 1987.
    Steitz J. A. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In: Biological Regulation and Development (R. Goldberg ed.), Vol. 1, pp. **349-399.** New York, Plenum, 1979.
11. *Rich A.* Polyribisomes. Sci. Am., **209(6)**, 44-53, 1963.
12. *Hunt T.* Phosphorylation and the control of protein synthesis. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **302**, 127-134, 1983.
    Jagus R., Anderson W. F., Safer B. The regulation of initiation of mammalian protein synthesis. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **25**, 127-185, 1981.
13. *Kirkwood T.B., Rosenberger R.F., Galas D. J., eds.* Accuracy in Molecular Processes: Its Control and Relevance to Living Systems. London, Chapman and Hall, 1986. (Chapters 4, 5, 6 and 11.)
    Thompson R. C. EFTu provides an internal kinetic standard for translational accurancy. Trends Biochem. Sci., **13**, 91-93, 1988.
14. *Jimenez A.* Inhibibitors of translation. Trends Biochem. Sci., **1**, 28-30, 1976.

15. *Alberts B.M.* The function of the hereditary materials: biological catalyses reflect the cell's evolutionary history. Am. Zool., *26,* 781-796, 1986.
Orgel L.E. RNA catalysis and the origin of life. J. Theor. Biol. **123**, 127-149, 1983.
Weiner A. M., Maizels N. tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: implications for the origin of protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7383-7387, 1987.
16. *Friedberg E. C.* DNA Repa ir. San Francisco, Freeman, 1985.
Lindahl T. DNA repair enzymes. Annu. Rev. Biochem., **51**, 61-88, 1982.
17. *Dickerson R., Geis 1.* The Structure and Action of Proteins, pp. 59-66. New York, Harper and Row, 1969.
Wilson A. C., Carbon S. S., White T. J. Biochemical evolution. Annu. Rev. Biochem., **46**, 573-639, 1977.
Wilson A. C., Ochman H., Prager E. M. Molecular time scale for evolution. Trends Genet., **3**, 241-247, 1987.
18. *Drake J. M.* Comparative rates of spontaneous mutation. Nature, **221,** 1132, 1969.
19. *Cairns J.* Cancer: Science and Society. San Francisco. Freeman, 1978. (Chapter 7 discusses the role of mutation in the development of cancer.)
Ohta T., Kimura M. Functional organization of genetic material as a product molecular evolution. Nature, **233**, 118-119, 1971. (The mutation rate limits the maximum number of genes in an organism.)
20. *Schrodinger E.* What is Life? Cambridge UK, Cambridge University Press, 1945.
21. *Kornberg A.* DNA Replication. San Francisco, Freeman, 1980. (Chapter 4 describes DNA polymerase. Chapter 8 describes DNA ligase, and Chapter 16 covers the general enzymol ogy of DNA repair.)
22. *Cleaver J. E., Karentz D.* DNA repair in man: regulation by a multigene family and association with human disease. Bioessays, 6, 122-127, 1987.
Coulondre C., Miller J. H., Farabaugh P. J., Giobert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *E.* coli. Nature, **274**, 775-780, 1978.
Lindahl T. New class of enzymes acting on damaged DNA. Nature, **259**, 64-66, 1976.
Sancar A.Z., Sancar G.B. DNA repair enzymes. Annu. Rev. Biochem. **57**, 29-67, 1988.
23. *Lindahl T., Sedgwick B., Sekiguchi M., Nakabeppu Y.* Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. Annu. Rev. Biochem., **57**, 133-157, 1988.
Ossanna N.. Peterson K. R., Mount D. W. Genetics of DNA repair in bacteria. Trends Genet., **2**, 55-58, 1986.
Walker G. C. Inducible DNA repair systems. Annu. Rev. Biochem., **54**, 425-457, 1985.
24. *Alberts B.M.* Prokaryotic DNA replication mechanisms. Philos. Trans. R. Soc. bond. (Biol.), 317, 395-420, 1987.
Kornberg A. DNA Replication. San Francisco, Freeman, 1980.
McMacken R., Silver L., Georgopoulos C. DNA replication. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology (F. C. Neidhardt ed.), pp. 564-612. Washington DC. American Society for Microbiology, 1987.
25. *Joyce C.M., Steitz T.A.* DNA polymerase I: from crystal structure to function via genetics. Trends Biocem. Sci., **12**, 288-292, 1987.
Kornberg A. Biologic synthesis of deoxyribonuclear acid. Science, **131**, 1503-1508. (Nobel prize address.)
Meselson M., Stahl F. W. The replication of DNA in *E. coli.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **44**, 671-682, 1958.
26. *Cairns J.* The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. J. Mol. Biol., **6,** 208-213, 1963.
Imman R. B., Schnos M. Structure of branch points in replicating DNA: presence of single-stranded connections in lambda DNA branch parts. J. Mol. Biol., **56,** 319-325, 1971. (Electron microscopy demonstrates that the replication fork is asymmetric.)
Ogawa T., Okazaki T. Discontinuous DNA replication. Annu. Rev. Biochem., **49,** 421-457, 1980.
27. *Brutlag D., Kornberg A.* Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid: a proofreading function for the 3' to 5' exonuclease activity in DNA polymerases. J. Biol. Chem., **247**, 241-248, 1972.
Fersht A. R. Enzymatic editing mechanisms in protein synthesis and DNA replication. Trends Biochem. Sci., **5,** 262-265, 1980.
Topal M., Fresco J. R. Complementary base pairing and the origin substitution mutations. Nature, **263**, 285-289, 1976.
28. *Rowen L., Kornberg A.* Primase, the *dnaG* protein of *Escherichia coli:* an enzyme which starts DNA chains. J. Biol. Chem., **253,** 758-764, 1978.
29. *Abdel-Monem M., Hoffmann-Berling H.* DNA unwinding enzymes. Trends Biochem. Sci., **5**, 128-130, 1980.

Alberts B. M., Frey L. T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA, Nature, 227, 1313-1318, 1970.

Lohman T. M., Bujalowski W., Overman L. B. E. coli single strand binding protein: a new look at helix-destabilizing proteins. Trends Biochem. Sci., **13,** 250-254, 1988.

30. *Alberts B. M.* Protein machines mediate the basis genetic processes. Trends Genet., **1,** 26-30, 1985.
Kornberg A. DNA replication. J. Biol. Chem., 263, 1-4, 1988.
LeBowitz J., McMacken R. The *E. coli* dnaB replication protein is a DNA helicase. J. Biol. Chem., 261, 4738-4748, 1986.

31. *Modrich P.* DNA mismatch correction. Annu. Rev. Biochem., 56, 435-466, 1987.
Radman M., Wagner R. The high fidelity of DNA duplication. Sci. Am., **259(2)**, 40-47, 1988.

32. *Bramhill D., Kornberg A.* Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. Cell, **52**, 743-755, 1988.
Dodson M. et al. Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage lambda: localized unwinding of duplex DNA by a six-protein reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 7638-7642, 1986.
Zyskind J. W., Smith D. W. The bacterial origin of replication, ori C. Cell, **46**, 489-490, 1986.

33. *DiNardo S., Voelkel K., Sternglanz R.* RNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae:* topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81,** 2616-2620, 1984.
Wang J.C. DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem., 54, 665-698, 1985.

34. *Campbell J. L.* Eucaryotic DNA replication. Annu. Rev. Biochem., **55,** 733-771, 1986.

35. *Low K. B. ed.* The Recombination of Genetic Material. San Diego, Academic Press, 1988.
Stahl F. W. Genetic recombination. Sci. Am., **256(2)**, 90-101, 1987.
Whitehouse H.L.K. Genetic Recombination: Understanding the Mechanisms. New York, Wiley, 1982.

36. *Dressier D., Potter H.* Molecular mechanisms of genetic recombination. Annu. Rev. Biochem., **51**, 727-762, 1982.
Smith G. R. Mechanism and control of homologous recombination in *Escherichia coli.* Annu. Rev. Genet, 21, 179-201, 1987.

37. *Wetmur J. G., Davidson N.* Kinetics of renaturation of DNA. J. Mol. Biol., **31**, 349-370, 1968.

38. *Cox M. M., Lehman I. R.* Enzymes of general recombination. Annu. Rev. Biochem.**,** **56**, 229-262, 1987.
Kowalczykowski S. C. Mechanistic aspects of the DNA strand exchange activity of *E. coli* recA protein. Trends Biochem. Sci., **12,** 141-145, 1987.
Radding C. M. Recombination activities of *E. coli* recA protein. Cell, **25**, 3-4, 1981.

39. *Holliday R.* A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res., **5,** 282-304, 1964.
Meselson M. S., Radding C. M. A general model for genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 358-361, 1975.
Sigal N., Alberts B. Genetic recombination: the nature of a cross-strand exchange between two homologous DNA molecules. J. Mol. Biol., **71**, 789-793, 1972.

40. *Fincham J. R. S., Day P. R., Radford A.* Fungal Genetics, 4th ed. Berkeley, University of California Press, 1979.
Kourilsky P. Molecular mechanisms of gene conversion in higher cells. Trends Genet, **2**, 60-62, 1986.

41. *Campbell A.* Some general questions about movable elements and their implications. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **45**, 1-9, 1980.
Craig N. The mechanism of conservative site-specific recombination. Annu. Rev. Genet, **22**, 77-105, 1988.
Grindley N. D., Reed R. R. Transpositional recombination in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem., **54,** 863-896, 1985.
Mizuuchi K., Craigie R. Mechanism of bacteriophage mu transposition. Annu. Rev. Genet, **20**, 385-429, 1986.

42. *Joklik W.K.* ed. Virology, 2nd ed. Norwalk CT, Appleton and Lange, 1985. *Shapiro J.A. ed.* Mobile Genetic Elements. New York, Academic Press, 1983.
Watson J. D., Hopkins N. H., Roberts J. W., Steitz J. A., Weiner A. M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1987. (Chapter 24 provides a modern overview of eucaryotic viruses.)

43. *Hershey A.D., Chase M.* Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol., **36**, 39-56, 1952.
Luria S. E., Darnell J. E., Baltimore D., Campbell A. General Virology, 3rd ed.

New York, Wiley, 1978. (The introductory chapter provides a historical overview of the development of virology.)
44. *Simons K., Garoff H., Helenius A.* How an animal virus gets in and out of its host cell. Sci. Am., **246(2)**, 58-66, 1982.
45. *Gierer A., Schramm G.* Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. Nature, **177**, 702-703, 1956.
46. *Cohen S.S.* Virus-Induced Enzymes. New York, Columbia University Press, 1968.
47. *Kornberg A.* DNA Replication. San Francisco, Freeman, 1980. (Chapters 14 and 15 provide up-to-date, beautifully illustrated description of the varieties of ways phage and animal viral DNA's replicate.)
48. *Campbell A.M.* Bacteriophage lambda as a model system. Bioessys, **5**, 277-280, 1986.
Daniels D., Sanger F., Coulson A. R. Features of bacteriophage lambda: analysis of the complete nucleotide sequence. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **47**, 1009-1024, 1982.
Lwoff A. Lysogeny. Bacteriol. Rev., **17,** 269-337, 1952.
49. *Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J. W., Steitz J.A., Weiner A.M.* Molecular Biology of the Gene, 4th ed. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1987. Chapter 26 describes the viruses that can cause tumors.)
50. *Baltimore D.* Virap DNA-dependent DNA polymerase. Nature, **226,** 1209-1211, 1970.
Gallo R.C. The AIDS virus. Sci. Am., **256(1),** 46-56, 1987.
Temin H. M., Mizutani A. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature, **226**, 1211-1213, 1970.
Varmus H. Retroviruses. Science, **240,** 1427-1435, 1988.
51. *Boeke J.D., Garfinkel D.J., Styles C.A., Fink G.R.* Ty elements transpose through an RNA intermediate. Cell, **40**, 491-500, 1985.
Fink G. R., Boeke J. D., Garfinkel D. J. The mechanisms and consequences of retrotransposition. Trends Genet., **2,** 118-123, 1986.
52. *Cohen S.N., Shapiro J.A.* Transposable genetic elements. Sci. Am., **242(2)**, 40-49, 1980.
Mizuuchi K. Mechanism of transposition of bacteriophage Mu: polarity of the strand transfer reaction at the initiation of transposition. Cell, **39**, 395-404, 1984.
53. *Novick R.P.* Plasmids. Sci. Am., **243(6),** 102-127, 1980.
Reisner D., Gross H.J. Viroids. Annu. Rev, Biochem., **54,** 531-564, 1985.
Rossmann M.G. The evolution of RNA viruses. Bioessays, **7**, 99-103, 1987.
54. *Drlica K.* Understanding DNA and Gene Cloning. New York, Wiley, 1984.
Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
Watson J.D., Tooze J., Kurtz D. T. Recombinant DNA: A Short Course. New York, W.H. Freeman, 1983.
55. *Smith H. O.* Nucleotide sequence specifity of restriction endonucleases. Science, **205**, 455-462, 1979.
56. *Cohen S., Chang A., Boyer H., Helling R.* Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 3240-3244, 1973.
57. *Maniatis T. et al.* The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell, **15,** 687-701, 1978.
Maniatis T., Kee S. G., Efstratiadis A., Kafatos F. C. Amplification and characterization of a β-globin gene synthesized *in vitro.* Cell, **8**, 163-182, 1976.
58. *Hedrick S. M., Cohen D. I., Nielsen E. A., Davis M. M.* Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature, **308,** 149-153, 1984.
59. *Grunstein M., Hogness D. S.* Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 3961-3965, 1975.
Suggs S. V., Wallace R.B., Hirose T., Kawashima E.H., Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned sequences for human β_2-microglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 6613-6617, 1981.
60. *Coulson A., Sulston J., Brenner S.. Karn J.* Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabaitis elegans.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 7821-7825, 1986.
Proustka A., Lehrach H. Jumping libraries and linking libraries: the next generation of molecular tools in mammalian genetics. Trends Genet., **2**, 174-179, 1986.
61. *Pelham H.R.B., Jackson R. J.* An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem., 67, 247-256, 1976.
62. *Geysen H. M. et al.* Chemistry of antibody binding to a protein. Science, **235**, 1184-1190, 1987.
Gilbert W., Villa-Komaroff L. Usefull proteins from recombinant bacteria. Sci. Am., **242(4)**, 74-94, 1980. *Yokata T. et al.* Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse

interleukin 2 cDNA clones: expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82,** 68-72, 1985.

Young R. A., Davis R. W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 1194-1198, 1980.

63. *Smith M.* In vitro mutagenesis. Annu. Rev. Genet., **19,** 423-462, 1985.
64. *Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R.* Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 1929-1933, 1978.

Pa/miter R. D., Brinster R. L. Germ line transformation of mice. Annu. Rev. Genet, **20**, 465-499, 1986.

Spradling A.C., Rubin G. M. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. Science**, 218**, 341-347, 1982.

Thomas K. R., Capecchi M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell, **51**, 503-512, 1987.

65. *Marx J.L.* Multiplying genes leaps and bounds. Science, **240**, 1408-1410, 1988.

Saiki R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, **239**, 487-491, 1988.

66. *Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., **32**, 314-331, 1980. Mapping and Sequencing the Human Genome. Washington DC, National Academy Press, 1988.

White R., LaLouel J.-M. Chromosome mapping with DNA markers. Sci. Am. **258(2)**, 40-49, 1988.

6. Плазматическая мембрана

Плазматическая мембрана, окружающая каждую клетку, определяет ее величину и обеспечивает сохранение существующих различий между клеточным содержимым и окружающей средой. Мембрана служит высокоизбирательным фильтром и, кроме того, отвечает за активный транспорт; с ее помощью регулируется поступление внутрь клетки питательных веществ и выход наружу продуктов выделения. Благодаря мембране устанавливается разница в концентрации ионов внутри клетки и во внеклеточном пространстве. Еще одна функция мембраны заключается в восприятии внешних сигналов, что позволяет клетке быстро отвечать на изменения, происходящие в окружающей среде.

Все биологические мембраны, включая плазматическую мембрану и внутренние мембраны эукариотических клеток, имеют общие структурные особенности: они представляют собой ансамбли липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий. Благодаря этим взаимодействиям поддерживается структурная целостность мембран: Однако сами по себе клеточные мембраны являются подвижными, «текучими» структурами и большинство входящих в их состав молекул способны перемещаться в плоскости мембраны. Как показано на рис. 6-1, липидные молекулы образуют непрерывный двойной слой толщиной около 5 нм. **Липидный бислой - это** основная структура мембраны, которая и создает относительно непроницаемый барьер для большинства водорастворимых молекул. Белковые молекулы как бы «растворены» в липидном бислое. С их помощью выполняются разнообразные функции мембраны. Одни мембранные белки обеспечивают транспорт молекул внутрь клетки или из нее, другие являются ферментами и катализируют ассоциированные с мембраной реакции. Еще один класс белков осуществляет структурную связь плазматической мембраны с цитоскелетом, с одной стороны, и(или) с внеклеточным матриксом либо с соседней клеткой - с другой. Отдельную группу составляют белки, выполняющие роль рецепторов для получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды. Как и следовало ожидать, мембраны асимметричны; оба их слоя различаются по липидному и белковому составу, что отражает, по-видимому, функциональные различия их поверхностей.

Несмотря на то что каждому типу мембран присущи определенные липидные и белковые компоненты, основные структурные и функциональные особенности, обсуждаемые в этой главе, характерны как для внутриклеточных, так и для плазматических мембран. Прежде всего нам хотелось бы рассмотреть структуру и организацию главных компонентов всех биологических мембран - липидов, белков и углеводов. Затем мы обсудим механизмы, используемые клетками для транспорта малых молекул через плазматическую мембрану, а также способы поглощения и выделения клетками макромолекул и крупных частиц. В последующих главах будут проанализированы некоторые дополнительные функции плазматической мембраны: роль в клеточной адгезии (гл. 14) и в сигнальных функциях (гл. 12).

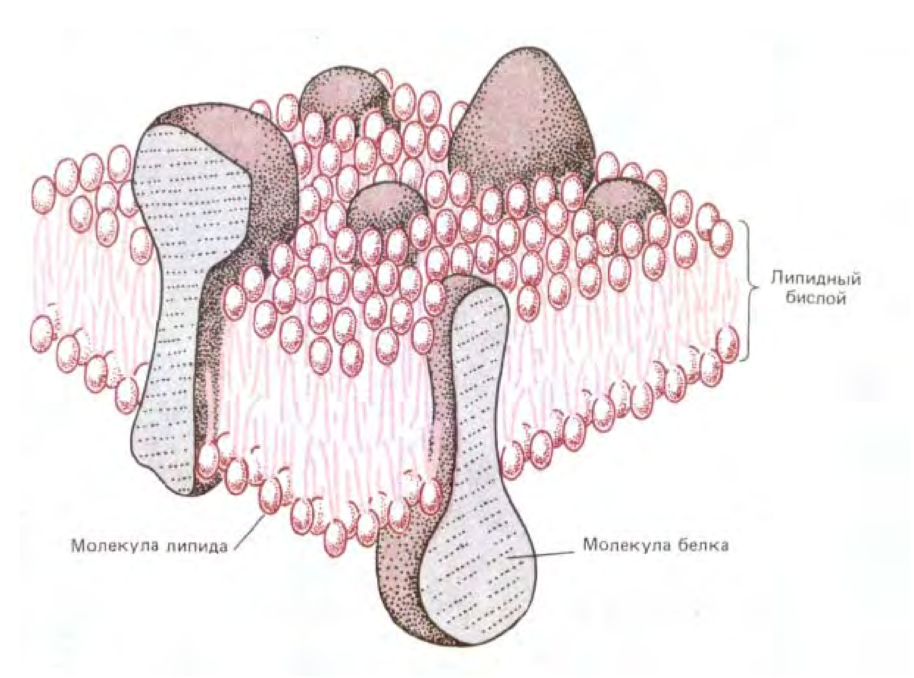


Рис. 6-1. Схематическое трехмерное изображение небольшого участка клеточной мембраны.

6.1. Липидный бислой [1]

Первые сведения о том, что молекулы липидов в биологической мембране образуют бислой, были получены в ходе простых, но элегантных экспериментов, выполненных в 1925 году. Было показано, что липиды из мембран эритроцитов, экстрагированные ацетоном, всплывают на поверхность воды, образуя пленку. Площадь пленки уменьшали с помощью подвижного барьера до тех пор, пока не формировался сплошной мономолекулярный слой. При этом оказалось, что площадь монослоя примерно в два раза больше первоначальной площади поверхности клеток. Поскольку единственной мембраной эритроцитов является плазматическая мембрана, экспериментаторы заключили, что молекулы липидов в ней должны быть организованы в виде непрерывного *бислоя*. Это заключение имело глубокое влияние на всю клеточную биологию. В настоящее время наличие **липидного бислоя** в клеточных мембранах доказано и более тонкими методами. Например, с помощью рентгеноструктурного анализа было продемонстрировано существование липидных бислоев в высокоорганизованных складках клеточных мембран, которые формируют изолирующую миелиновую оболочку, окружающую нервные клетки (см. разд. 19.2.4). О том, что все биологические мембраны содержат липидные бислой, убедительно свидетельствуют и данные электронно-микроскопических исследований: при изучении образцов, приготовленных методом замораживания скалывания, оказалось, что все клеточные мембраны могут быть механически расщеплены как раз между двумя липидными монослоями (см. разд. 6.2.6). Самопроизвольное формирование бислоя является особым свойством молекул липидов, которое реализуется даже вне клетки.

6-4

6.1.1. Мембранные липиды - это амфипатические молекулы, самопроизвольно формирующие бислой [2]

Липиды нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в органических растворителях. В большинстве животных клеток они составляют около 50% массы плазматической мембраны животных, а почти все остальное приходится на белки. На 1 мкм^2 липидного бислоя расположено пример-

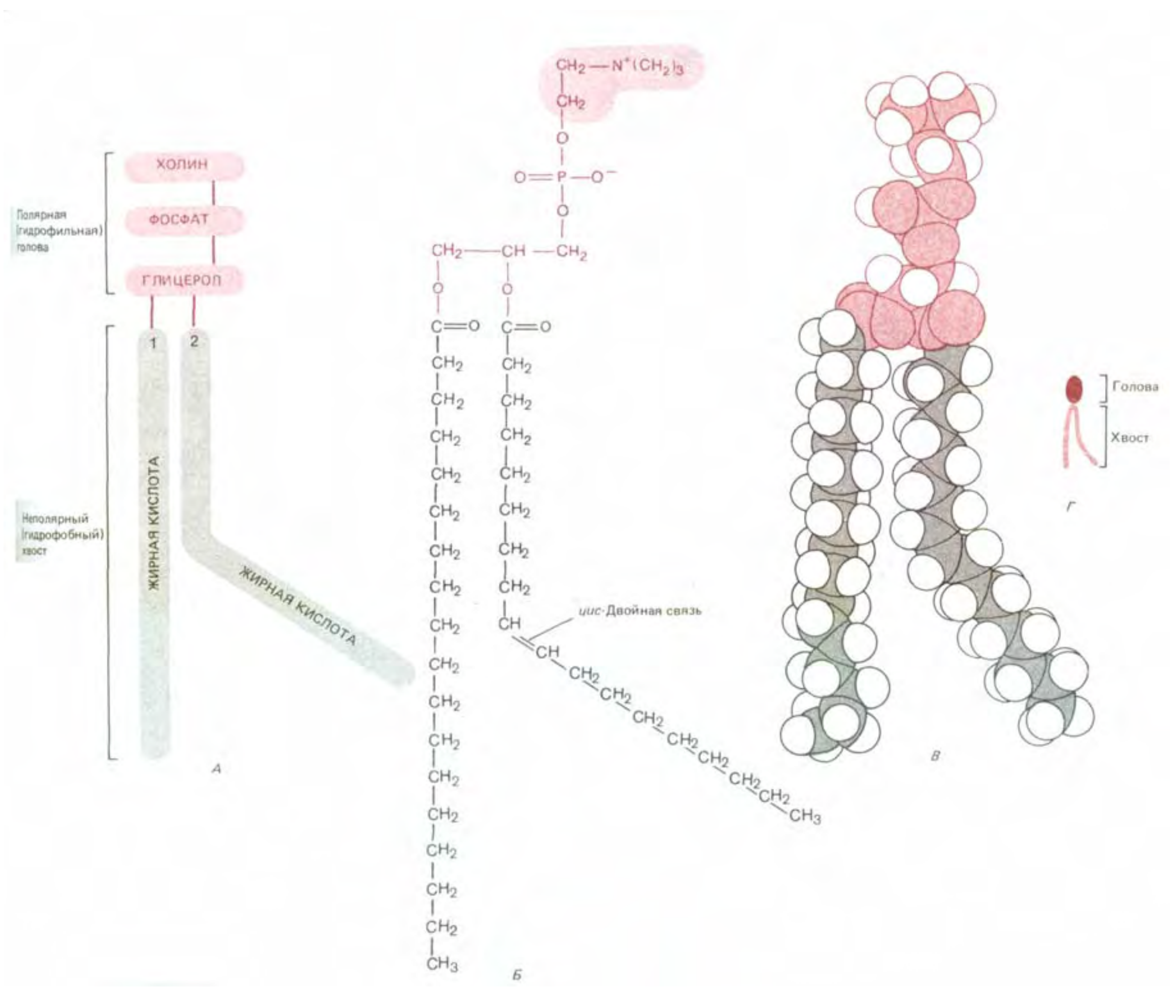


Рис. 6-2. Молекула фосфолипида фосфатидилхолина, представленная схематически *(А),* химической формулой (*Б*), в виде пространственной модели *(В)* и символом (Г). Чтобы отличить ненасыщенную цепь жирной кислоты от насыщенной, на этом рисунке (и далее везде) ненасыщенная цепь изображена с отчетливым изгибом. На самом же деле в ненасыщенной жирной кислоте жесткостью обладает только двойная связь. Вокруг всех одинарных связей возможно свободное вращение, поэтому в каждом липидном монослое обе цепи жирных кислот - как насыщенная, так и ненасыщенная - будут стремиться упаковаться параллельно.

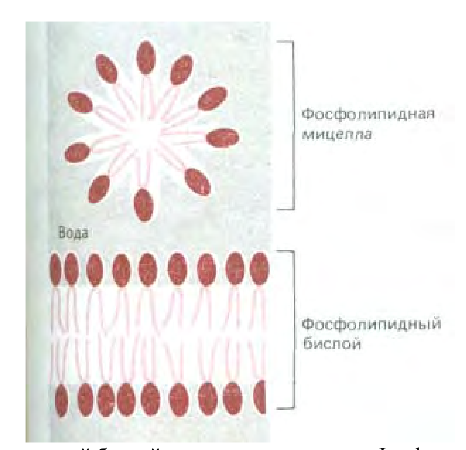


Рис. 6-3. Фосфолипидная мицелла и фосфолипидный бислой в поперечном разрезе. Фосфолипидные молекулы самопроизвольно образуют подобные структуры в воде.

но 5 x 10^6 молекул липидов. Из этого следует, что в плазматической мембране небольшой животной клетки содержится около 10^9 молекул липидов. В клеточной мембране присутствуют липиды трех типов: *фосфолипиды* (наиболее распространенный тип), *холестерол* и *гликолипиды.* Все они представляют собой *амфипатические* молекулы, т. е. у них есть гидрофильный («любящий воду», или полярный) и гидрофобный («боящийся воды», или неполярный) концы. Типичная молекула **фосфолипида** изображена на рис. 6-2. Она имеет *полярную голову и два гидрофобных углеводородных хвоста.* Длина хвостов варьирует от 14 до

24 атомов углерода в цепи. Один из хвостов, как правило, содержит одну или более *цис*-двойных связей (т. е. это *ненасыщенный* углеводород), тогда как у другого *(насыщенного* углеводорода) двойных связей нет. Как показано на рис. 6-2, каждая двойная связь вызывает появление изгиба в хвосте. Различия в длинах хвостов и насыщенности углеводородных цепей имеют важное значение, поскольку именно они влияют на расположение фосфолипидных молекул друг против друга и, следовательно, обусловливают текучесть мембраны (см. ниже).

Именно амфипатический характер молекул липидов заставляет их самопроизвольно формировать бислои в водных растворах. Когда амфипатические молекулы находятся в водном окружении, они стремятся агрегировать так, чтобы их гидрофобные хвосты были спрятаны от молекул воды, а гидрофильные головки оказались в контакте с молекулами воды. Агрегация такого типа осуществляется двумя способами: либо путем образования *сферических мицелл,* с хвостами, обращенными внутрь, либо путем формирования бимолекулярных пленок, или бислоев, в которых гидрофобные хвосты располагаются между двумя слоями гидрофильных голов. Обе эти возможности проиллюстрированы на рис. 6-3.

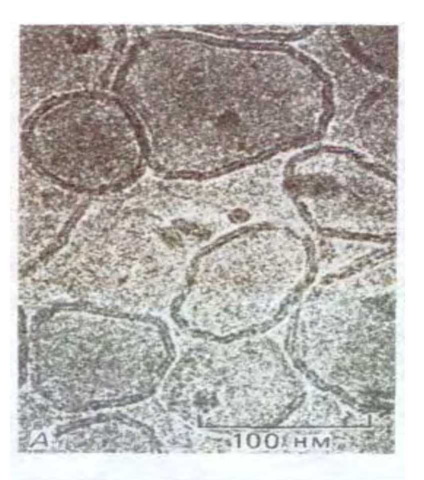
Большинство фосфолипидов и гликолипидов в водной среде самопроизвольно образуют бислои. Более того, эти липидные бислои имеют тенденцию к замыканию самих на себя, что приводит к формированию закрытых отсеков (компартментов). При этом устраняются свободные края, на которых гидрофобные хвосты могли бы соприкасаться с водой. По той же причине компартменты, построенные из липидных бислоев, стремятся сами залечить свои повреждения, смыкая края разорванных участков. Кроме способности к самосборке липидный бислой обладает и другими характеристиками, делающими его идеальным материалом для клеточных мембран. Важнейшее из этих свойств - текучесть, которая, как мы увидим в дальнейшем, обусловливает многие функции мембраны.

6-6
6-7

6.1.2. Липидный бислой - это двумерная жидкость [3]

О том, что отдельные молекулы липидов способны свободно диффундировать в пределах липидного бислоя, исследователи впервые узнали, как это ни странно, только в начале 1970-х годов. Первоначально это было показано на искусственных липидных бислоях. Для экспериментальных исследований оказались весьма полезными искусственные бислои двух типов: 1) **липосомы,** имеющие форму сферических пузырьков, диаметр которых варьирует от 25 нм до 1 мкм в зависимости от способа их получения (рис. 6-4), и 2) плоские бислои, называемые **черными мембранами,** «закрывающие» отверстие в перегородке между двумя отделениями сосуда, заполненными водой (рис. 6-5).

Для измерения подвижности отдельных липидных молекул и их частей используются разнообразные методы. Так, к полярной голове молекулы липида можно присоединить «спиновую метку», например нитроксильную группу (= N — O), имеющую неспаренный электрон. Спин этого электрона порождает парамагнитный сигнал, обнаруживаемый методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (принципы этого метода сходны с принципами ядерного магнитного резонанса. ЯМР). Этот метод позволяет легко определить движение и ориентацию в бислое подобного спин-меченного липида. Такие исследования показывают, что липидные молекулы в синтетических мембранах чрезвычайно редко перескакивают из одного монослоя мембраны в другой. Любая индивидуальная молекула липида осуществляет подобный пере-



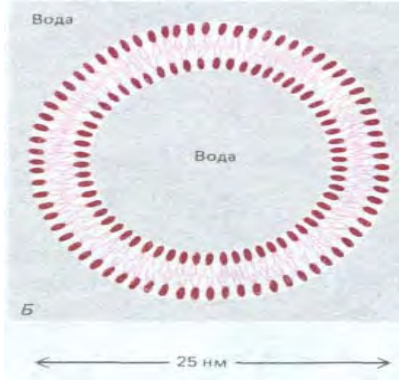


Рис. 6-4, *А.* Электронная микрофотография нефиксированных неокрашенных фосфолипидных пузырьков (липосом) в воле. Обратите внимание, что бислойная структура везикул легко различима. *Б.* Схематическое изображение небольшой сферической липосомы в поперечном разрезе. Липосомы обычно используются в экспериментальных исследованиях в качестве модельных мембран. *(А - с* любезного разрешения Jean Lepault.)

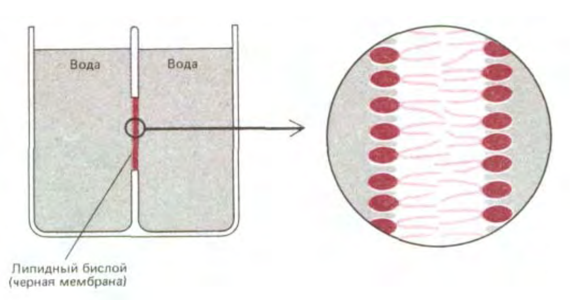


Рис. 6-5. Схематическое изображение искусственного липидного бислоя, называемого черной мембраной, в поперечном разрезе. Мембрана закрывает небольшое отверстие в перегородке между двумя отделениями сосуда, заполненными водой. Черные мембраны используются для измерения проницаемости искусственных мембран.

скок (флип-флоп) реже, чем один раз в две недели (рис. 6-6). С другой стороны, липидные молекулы без труда меняются местами со своими соседями в пределах одного монослоя (примерно 10^7 раз в 1 с), что приводит к быстрой латеральной диффузии, причем коэффициент диффузии D составляет около 10^{-8} $см^2с^{-1}$. Это означает, что липидная молекула средних размеров диффундирует на расстояние, равное длине большой бактериальной клетки (~ 2 мкм), приблизительно за 1 с. Кроме того, подобные исследования показывают, что молекулы липидов очень быстро вращаются вокруг своих продольных осей, а их углеводородные цепи обладают гибкостью; при этом наибольшая подвижность наблюдается у центра бислоя, а наименьшая - около полярной головы (рис. 6-6).

Изучение меченых липидных молекул в изолированных биологических мембранах и относительно простых целых клетках, таких как микоплазма, бактерии и эритроциты, показало, что поведение липидных молекул в клеточных мембранах в основном сходно с поведением этих молекул в искусственных бислоях. Липидный компонент биологической мембраны представляет собой двумерную жидкость, в которой отдельные молекулы липидов могут свободно передвигаться в плоскости мембраны. Как и в синтетических бислоях, индивидуальные молекулы липидов обычно не выходят за пределы своего монослоя. Однако существуют исключения: в таких мембранах, в которых липиды активно синтезируются (например, в мембранах эндоплазматического ретикулума) должен идти быстрый флип-флоп специфических липидов. Для ускорения этого процесса имеются даже специальные мембраносвязанные ферменты - *транслокаторы фосфолипидов* (см. разд. 8.6.14).

6.1.3. Текучесть липидного бислоя зависит от его состава [4]

Синтетический липидный бислой, состоящий из фосфолипидов одного типа, при понижении температуры до строго определенного значения (точки замерзания) переходит из жидкого состояния в кристаллическое (или гелеобразное). Это изменение состояния называется *фазовым переходом*. Температура перехода оказывается ниже (т. е. мембрану трудно заморозить), если углеводородные цепи короткие или в них содержатся двойные связи. При меньшей длине цепи взаимодействие углеводородных хвостов становится менее вероятным, а изломы, вызванные наличием *цис*-двойных связей, мешают более компактной упаковке хвостов (рис. 6-7).

В синтетическом бислое, содержащем смесь фосфолипидов с различной степенью насыщенности (и, следовательно, с различными температурами фазового перехода), может происходить *разделение фаз:* при снижении температуры до точек замерзания фосфолипидные молекулы определенного типа спонтанно агрегируют внутри бислоя, образуя

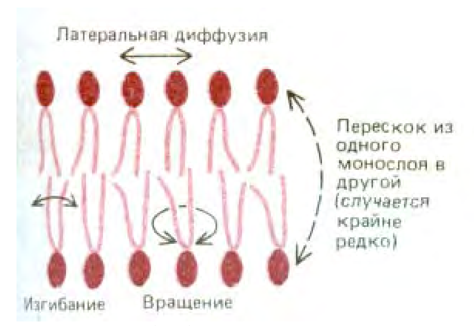


Рис. 6-6. Типы движений фосфолипидных молекул в липидном бислое.

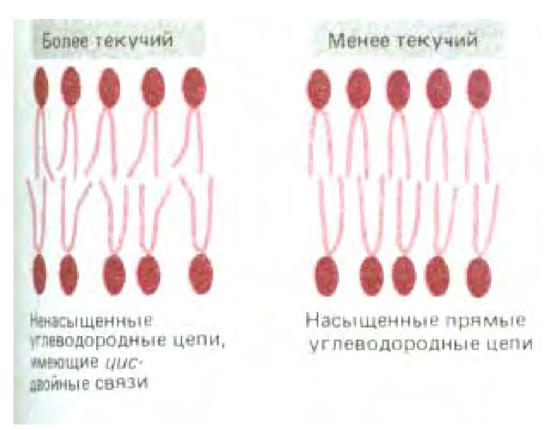


Рис. 6-7. Двойные связи в ненасыщенных углеводородных цепях увеличивают текучесть липидного бислоя, затрудняя совместную упаковку гидрофобных хвостов.

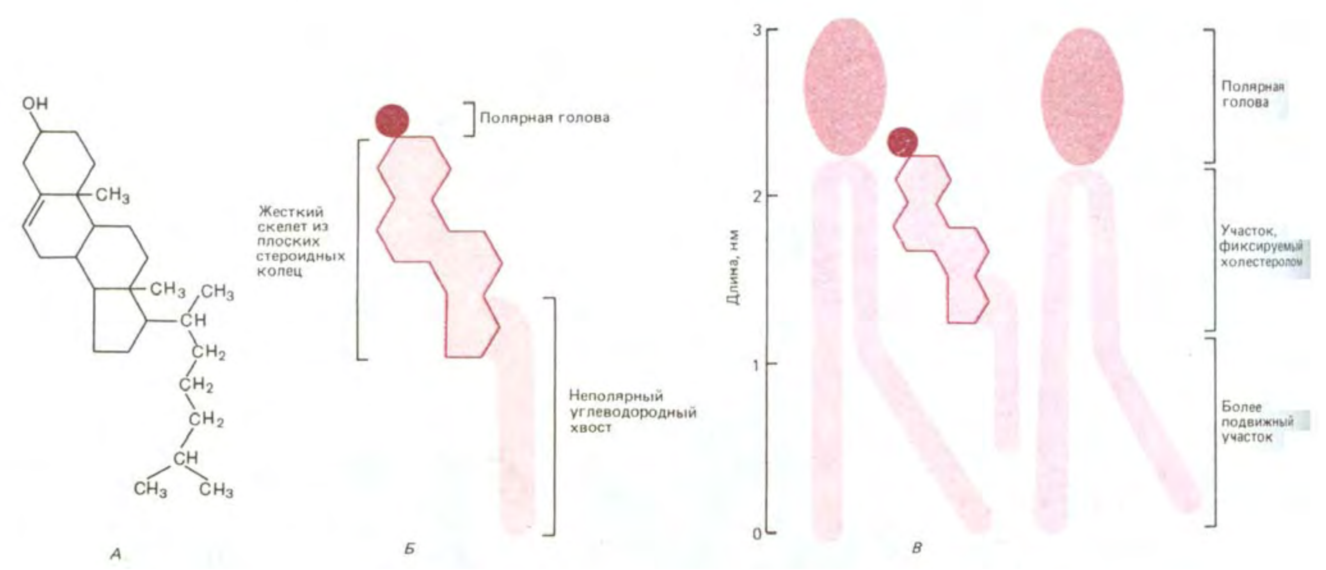


Рис. 6-8. Молекула холестерола, представленная в виде химической формулы *(А),* схематического изображения *(Б)* и в процессе взаимодействия с двумя фосфолипидными молекулами в монослое *(В).*

«замороженные» частицы. Поскольку в биологических мембранах в одной и той же липидной молекуле обычно содержится как насыщенная, так и ненасыщенная цепь жирной кислоты, в клетке такое разделение фаз невозможно.

Другим фактором, влияющим на текучесть мембраны, служит **холестерол.** Плазматические мембраны эукариот содержат довольно большое количество холестерола - приблизительно одну молекулу на каждую молекулу фосфолипида. Молекулы холестерола ориентируются в бислое таким образом, чтобы их гидроксильные группы примыкали к полярным головам фосфолипидных) молекул. При этом их жесткие, плоские стероидные кольца частично иммобилизуют участки углеводородных цепей, непосредственно примыкающих к полярным головам. Остальные части углеводородных цепей не утрачивают своей гибкости (рис. 6-8). Хотя холестерол делает липидный бислой менее текучим, при его высоких концентрациях (что характерно для большинства плазматических мембран эукариотических клеток), он предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей. Таким образом, холестерол также ингибирует возможные фазовые переходы.

Холестерол уменьшает не только текучесть липидного бислоя, такое же действие он оказывает на его проницаемость для малых водорастворимых молекул. Кроме того, холестерол увеличивает упругость и механическую прочность бислоя. Именно благодаря холестеролу мембрана может менять свою форму в ответ на приложенную к ней силу. Дело в том, что в отличие от фосфолипидов, холестерол может быстро перераспределяться между монослоями. Объясняется это тем, что маленькая полярная голова холестерола (гидроксильная группа) относительно легко проходит через центр бислоя, энергетический барьер для флип-флоп молекул холестерола оказывается низким, и, следовательно, его перераспределение осуществляется быстро.

О важности холестерола для поддержания механической прочности мембран говорят данные по изучению мутантных линий животных клеток, не способных его синтезировать. При отсутствии холестерола в культуральной жидкости такие клетки быстро лизируются (разрываются с высвобождением их содержимого). Добавленный в среду холестерол встраивается в плазматическую мембрану, тем самым стабилизируя липидный бислой; в результате клетки выживают.

Определенная текучесть плазматической мембраны имеет важное

биологическое значение. Об этом свидетельствует тот факт, что бактерии, дрожжи и другие пойкилотермные организмы, принимающие температуру окружающей среды, изменяют жирнокислотный состав своих плазматических мембран таким образом, чтобы текучесть мембраны оставалась примерно постоянной. Например, при падении температуры начинают синтезироваться жирные кислоты с большим числом *цис*-двойных связей, для того чтобы предотвратить уменьшение текучести бислоя, которое может при этом произойти. Было показано, что некоторые процессы мембранного транспорта приостанавливаются и определенные ферментативные активности исчезают как только вязкость бислоя превышает некое пороговое значение. Остается установить, какие именно процессы, связанные с мембранами, наиболее сильно зависят от текучести бислоя.

6.1.4. Липидный бислой служит растворителем для мембранных белков [5]

Липидные составы различных биологических мембран сравниваются в табл. 6-1. Плазматические мембраны бактерий обычно имеют фосфолипид только одного типа и не содержат холестерол; в отсутствие холестерола механическая прочность обеспечивается окружающей клеточной стенкой (см. рис. 5-54). В то же время в большинстве плазматических мембран эукариотических клеток имеется не только значительное количество холестерола, но и множество различных фосфолипидов. Например, в плазматической мембране многих животных клеток обнаруживаются четыре основных фосфолипида: *фосфатидилхолин, сфингомиелин, фомфатидилсерин* и *фосфатидилэтаноламин.* Структуры этих молекул приведены на рис. 6-9; отметим, что из них только фосфатидилсерин имеет отрицательный заряд, а остальные три при физиологических pH оказываются электрически нейтральными. Эти четыре фосфолипида вместе составляют более половины всей массы липидов для большинства мембран (табл. 1-6). Другие фосфолипиды, такие, как *инозитолфосфолипиды* (см. разд. 12,3.9), тоже важны в функциональном отношении, но представлены в относительно малых количествах. Исключительная роль инозитолфосфолипидов в передаче клеточных сигналов обсуждается в гл. 12.

Таблица 6-1. Примерный липидный состав различных клеточных мембран

Липиды	**Процент от общего содержания липидов (по весу)**					
	Плазматическая мембрана клеток печени	Плазматическая мембрана эритроцитов	Миелин	Внешняя и внутренняя мембрана митохондрий	ЭР	*E. coli*
Холестерол	17	23	22	3	6	0
Фосфатидилэтаноламин	7	18	15	35	17	70
Фосфатидилсерин	4	7	9	2	5	следы
Фосфатидилхолин	24	17	10	39	40	0
Сфингомиелин	19	18	8	0	5	0
Гликолипиды	7	3	28	следы	следы	0
Другие	22	13	8	21	27	30

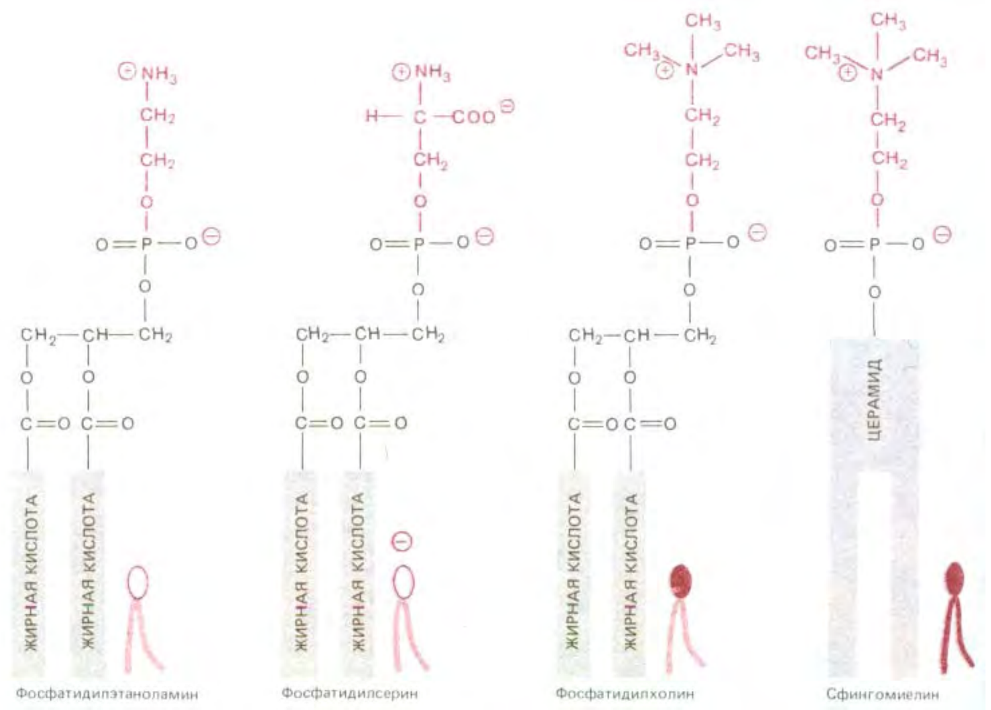


Рис. 6-9. Формулы и символы четырех главных фосфолипидов, содержащихся в плазматических мембранах. Обратите внимание, что различные полярные головы обозначены разными символами (на этом и следующем рисунке). Все представленные липидные молекулы построены на основе глицерола, за исключением сфингомиелина, происходящего от серина. Структура и формула церамида представлены на рис. 6-11.

Возникает вопрос; с чем связано такое разнообразие фосфолипидов в плазматических мембранах эукариот? Возможно, липидный бислой является двумерным растворителем для белков в составе мембраны, подобно тому как вода служит трехмерным растворителем в водном растворе. Можно предположить также, что некоторые мембранные белки функционируют только в присутствии специфических фосфолипидных полярных групп, напоминая в этом отношении многие ферменты, для активирования которых в водном растворе необходим какой-либо определенный ион. Это предположение подтверждается данными о том, что в искусственных липидных бислоях для оптимальной активности функционирующих мембранных белков требуются определенные специфические фосфолипиды.

6-5
6-6

6.1.5. Липидный бислой асимметричен [6]

Во всех изученных плазматических мембранах две половины бислоя поразительно различаются по липидному составу. Например, в мембране эритроцитов человека большинство липидных молекул, оканчивающихся холином $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH$ - т. е. фосфатидилхолин и сфингомиелин, располагаются во внешней половине бислоя, а основная часть фосфолипидов, несущих на конце аминогруппу (фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин), - во внутренней (рис. 6-10). Хвосты жирных кислот, входящих в состав фосфатидилхолина и сфингомиелина более насыщенны, чем те, которые находятся в составе фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина. В связи с этим асимметрия в распределении полярных голов сопровождается асимметрией распределения углеводородных хвостов. Это может привести к тому, что текучесть внутреннего монослоя будет несколько больше, чем внешнего. Известно также, что отрицательно заряженный фосфатидилсерин локализован во внутренней половине бислоя; следовательно, две стороны бислоя существенно различаются и по заряду.

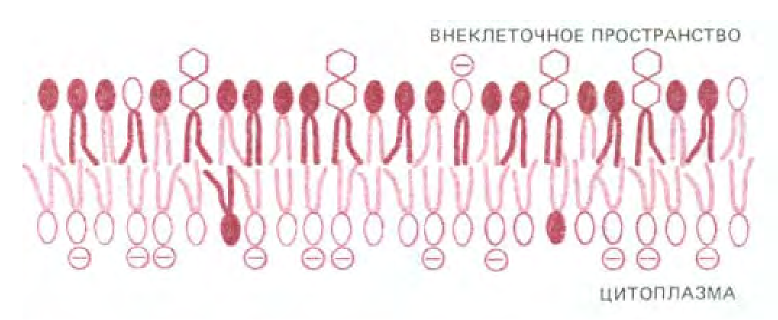


Рис. 6-10. Асимметрическое распределение фосфолипидов и гликолипидов в липидном бислое эритроцитов человека. Символы, используемые для обозначения фосфолипидов, те же, что и на рис. 6-9. Полярные головы гликолипидов изображены в виде шестиугольников. Холестерол (не показан), по-видимому, распределяется между монослоями примерно одинаково.

Большинство мембран эукариотических клеток, включая плазматическую мембрану, синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Это значит, что асимметрия в распределении фосфолипидов является следствием работы транслокаторов фосфолипидов в ЭР, которые переносят специфические молекулы фосфолипидов из одного монослоя в другой (см. разд. 8.6.14). Несмотря на то что функциональный смысл асимметричного распределения липидов во многом непонятен, показано, что существуют мембраносвязанные ферменты, использующие этот феномен. Например, при активации *протеинкиназы С* она связывается с цитоплазматической стороной плазматической мембраны, где концентрируется фосфатидилсерин - отрицательно заряженный фосфолипид, необходимый для работы фермента (см. разд. 12.3.10). Важность существования специфических инозитолфосфолипидов, сконцентрированных на цитоплазматической стороне бислоя, где они могут использоваться для генерации внутриклеточных медиаторов в ответ на внеклеточные сигналы, обсуждается в гл. 12.

6.1.6. Гликолипиды обнаруживаются на поверхности всех плазматических мембран, однако их функция неизвестна [7]

В плазматических мембранах животных клеток наиболее асимметрично распределены липидные молекулы, принадлежащие к классу олигосахаридсодержащих липидов, называемых **гликолипидами.** Эти удивительные молекулы обнаруживаются только в наружной половине бислоя, а их сахарные группы ориентированы к поверхности клетки (рис. 6-10), что свидетельствует об участии данных молекул во взаимодействии клетки с ее окружением. Асимметричное распределение гликолипидов в бислое создается при присоединении сахарных остатков к молекулам липидов, происходящем в цистернах аппарата Гольджи.

Гликолипиды, вероятно, присутствуют в плазматических мембранах всех животных клеток и составляют обычно около 5% липидных молекул наружного монослоя. Они сильно различаются у разных видов и даже в разных тканях одного и того же вида. У бактерий и растений почти все Гликолипиды - это производные липидов на основе глицерола, например, широко распространенного фосфатидилхолина. В животных клетках Гликолипиды построены на основе *церамида,* каковым является, например, фосфолипид сфингомиелин (см. рис. 6-9). Структура *гликосфинголипидов* в целом аналогична структуре фосфолипидов, образованных из глицерола. Они также имеют полярную голову и две гидрофобные цепи жирных кислот. Однако одна из цепей жирных кислот первоначально соединяется с серином, образуя *аминоспирт* сфингозин, с которым затем связывается вторая цепь жирной кислоты, образуя церамид (рис. 6-11).

Все гликолипидные молекулы различаются по числу сахарных остатков в их полярных головах. Среди множества гликолипидов плазмати-

Сфингозин Церамид Галактоцереброзид

Рис. 6-11. Заключительные этапы биосинтеза простого гликосфинголипида - галактоцереброзида. Сфингозин образуется при конденсации аминокислоты серина с одной молекулой жирной кислоты. Затем присоединяется вторая молекула жирной кислоты. При этом образуется церамид. Синтез церамида идет в ЭР, а углевод присоединяется в аппарате Гольджи. Церамид используется и при синтезе основного фосфолипида - сфингомиелина (см. рис. 6-9).

Рис. 6-12. Структура сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты, или NANA). В клетках она существует, как изображено на рисунке, в ионизованной форме ($—COC^-$).

ческих мембран эукариотических и прокариотических клеток можно выделить группу **нейтральных гликолипидов.** Их полярные головы содержат от 1 до 15 и более нейтральных (незаряженных) Сахаров, в зависимости от организма и типа клеток. *Пример - галактоцереброзид,* один из простейших гликолипидов, полярная голова которого состоит только из одной галактозы. Галактоцереброзид - это главный гликолипид *миелина,* многослойной мембранной оболочки, окружающей аксоны. Миелин представляет собой плазматическую мембрану специализированной миелинообразующей клетки, уложенную в виде множества концентрических слоев вокруг нервного волокна. Отличительная особенность этих клеток заключается в высоком содержании галактоцереброзида в их плазматической мембране (до 40% массы наружного монослоя). В мембранах других клеток галактоцереброзида мало. Это. возможно, означает, что он играет важную роль в специфическом взаимодействии миелинообразующей клетки и аксона.

Самые сложные из гликолипидов **- ганглиозиды -** содержат один или более остатков сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты, или NANA), которые придают молекулам ганглиозидов отрицательный заряд (рис. 6-12). Особенно много ганглиозидов содержится в плазматической мембране нервных клеток, где они составляют 5-10% от общей массы липидов, однако в большинстве типов клеток они встречаются в гораздо меньших количествах. В настоящее время идентифицировано

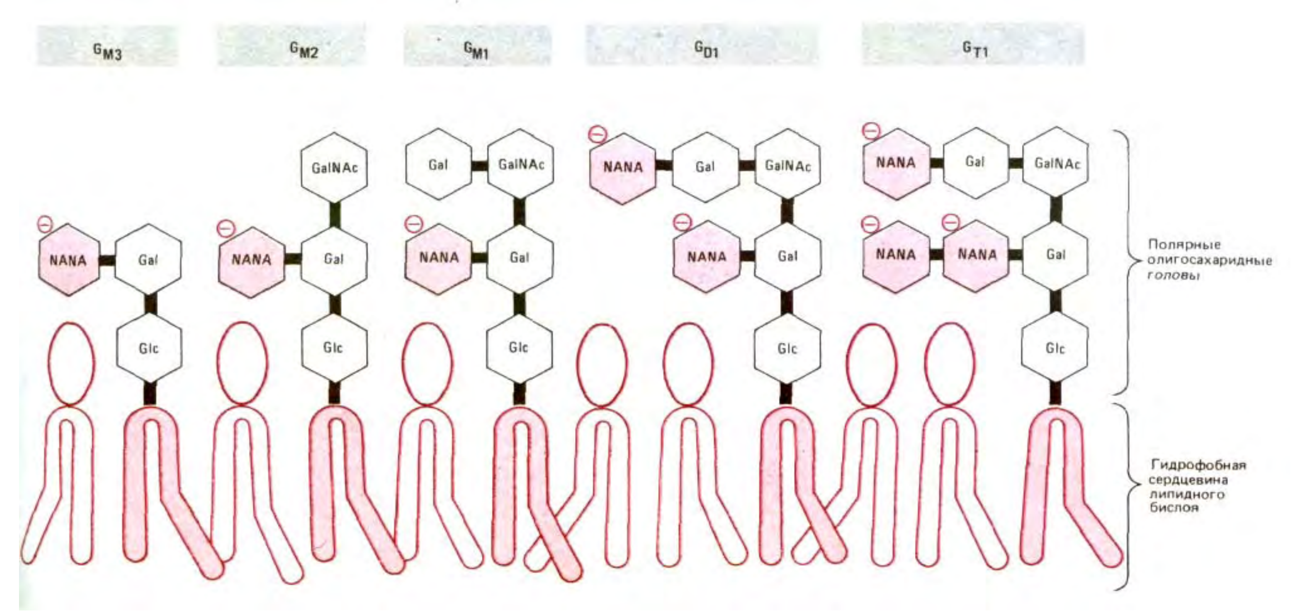


Рис. 6-13. Некоторые типичные ганглиозиды и их структурные обозначения. В G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}, G_{D1}, G_{T1}, буквы М, D и Т обозначают число остатков сиаловой кислоты -один, два и три соответственно, а цифры 1, 2 и 3 представляют собой разность, полученную вычитанием числа незаряженных углеводных остатков из 5. NANA-N-ацетилнейраминовая (сиаловая) кислота, Gal-галактоза, Glc-глюкоза, GalNAc-N-ацетилгалактозамин. GaJ, Glc и GalNAc не заряжены, а NANA несет отрицательный заряд (см. рис. 6-12).

более 40 различных ганглиозидов. Некоторые из них представлены на рис. 6-13, где приводится и номенклатура, используемая для описания этих соединений.

О функциях гликолипидов известно мало. Установлено, например, что ганглиозид G_{M1} (рис. 6-13) действует как поверхностный рецептор для бактериального токсина, вызывающего изнурительный понос при холере. Холерный токсин, связывается с поверхностью и попадает внутрь только тех клеток, у которых в плазматической мембране присутствует G_{M1} (к ним относятся, например, эпителиальные клетки кишечника). Проникновение холерного токсина внутрь клетки приводит к долговременному увеличению концентрации внутриклеточного cAMP, которое обусловливает сильный приток Na^+ и воды внутрь кишечника. Конечно, связывание бактериальных токсинов не может быть *нормальной* функцией ганглиозидов. Можно предположить, что они выступают в роли рецепторов для определенных медиаторов, осуществляющих нормальную связь между клетками.

Заключение

Биологические мембраны состоят из непрерывного двойного слоя липидных молекул с погруженными в него различными белками. Липидный бислой представляет собой жидкость, в которой отдельные молекулы липидов способны быстро диффундировать в пределах своего монослоя, но чрезвычайно редко спонтанно перемещаются из одного монослоя в другой. Мембранные липиды - амфипатические молекулы и в водной среде самопроизвольно образуют бислой. Эти бислой самоорганизуются в закрытые компартменты, которые способны самопроизвольно восстанавливаться при повреждениях. В плазматической мембране имеются три основных класса липидных молекул - фосфолипиды, холестерол и гликолипиды, причем составы внутреннего и наружного монослоев отличаются друг от друга. Разный липидный состав характерен как для плазматических мембран различных типов клеток, так и для разных мембран одной и той же эукариотической клетки. Функциональное значение различных компонентов разных мембран в большинстве случаев остается неизвестным.

6.2. Мембранные белки

Хотя основные структурные особенности биологической мембраны определяются свойствами липидного бислоя, большинство их специфических функций осуществляется белками. Вот почему типы белков и их количества в мембране сильно варьируют: в миелиновой мембране, которая служит преимущественно для изоляции аксонов, Белки составляют менее 25% массы мембраны, а в мембранах, связанных с процессами превращения энергии (например, во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов) на их долю приходится около 75% массы мембраны. В обычной плазматической мембране количество белков равно приблизительно половине ее массы, т. е. значение этого показателя среднее между указанными выше крайними величинами. Поскольку размер липидной молекулы весьма мал по сравнению с размерами молекулы белка, можно сделать вывод, что в мембране всегда содержится значительно больше молекул липидов, чем белков. Например, если белки составляют 50% массы мембраны, то на одну молекулу белка приходится приблизительно 50 липидных молекул.

6-10
6-11

6.2.1. Полипептидная цепь многих мембранных белков пронизывает липидный бислой один или несколько раз [8]

Многие мембранные белки пронизывают бислой насквозь (пример 1 и 2 на рис. 6-14). Подобно их липидным соседям эти, так называемые **трансмембранные белки,** обладают амфипатическими свойствами: у них есть гидрофобные участки, проходящие через мембрану и взаимодействующие с гидрофобными хвостами липидных молекул внутри бислоя, и гидрофильные участки, обращенные к воде с обеих сторон мембраны. Гидрофобность некоторых мембранных белков увеличивается за счет ковалентного присоединения цепи жирной кислоты, которая внедряется в бислой с его цитоплазматической стороны (примеры 1 и 2 на рис. 6-14). Некоторые внутриклеточные мембранные белки присоединены к бислою только с помощью цепи жирной кислоты (пример 3 на рис. 6-14), есть и такие поверхностные белки, которые ассоциированы с бислоем за счет ковалентных взаимодействий (через специфический олигосахарид) с фосфатидилинозитолом - минорным фосфолипидом, находящимся во внешнем липидном монослое плазматической мембраны (пример 4 на рис. 6-14).

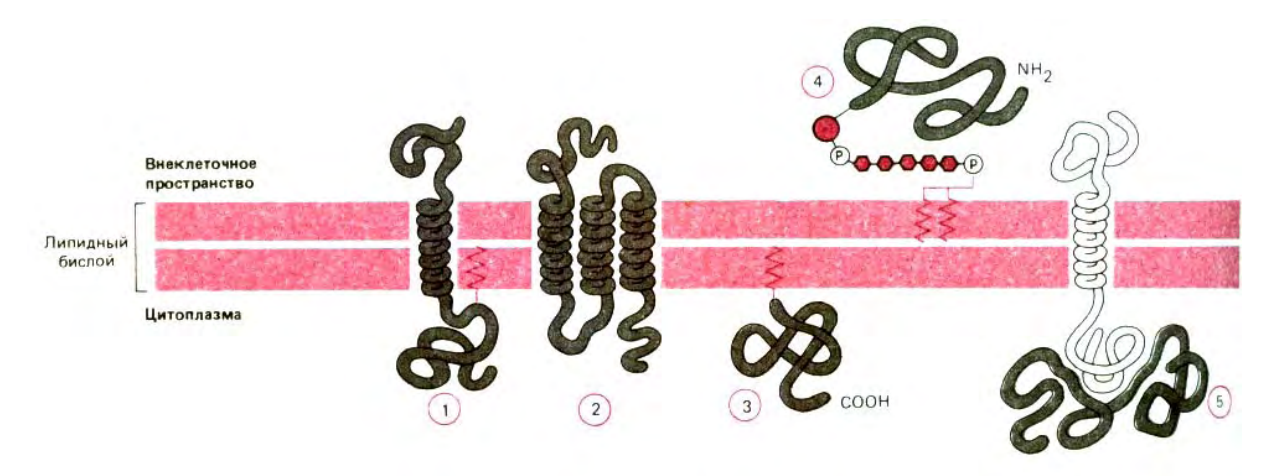


Рис. 6-14. Пять способов ассоциации мембранных белков с липидным бислоем. Трансмембранные белки пронизывают бислой в виде одиночной α-спирали (1) или нескольких α-спиралей (2). Некоторые из таких белков (1 и 2) имеют присоединенную ковалентно цепь жирной кислоты, погруженную в цитоплазматический монослой (1). Другие мембранные белки ассоциируют с бислоем только за счет ковалентно присоединенного к ним липида - либо цепи жирной кислоты, погруженной в цитоплазматический монослой (3), либо, гораздо реже, через фосфолипид фосфатидилинозитол, погруженный во внешний монослой и соединенный с белком через олигосахарид (4). Наконец, многие белки ассоциируют с мембраной только благодаря нековалентным взаимодействиям с другими мембранными белками (5). Детали обсуждаются в гл. 8.

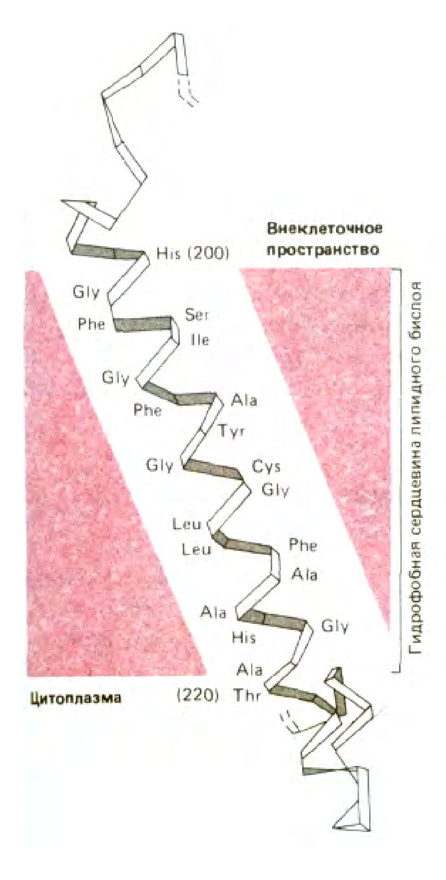


Рис. 6-15. Сегмент цепи трансмембранного полипептида, пронизывающего липидный бислой в виде α-спирали (по данным рентгеноструктурного анализа кристаллов мембранного белка). Показана только скелетная модель полипептидной цепи. Гидрофобные аминокислоты выделены цветом. Торчащие неполярные боковые группы аминокислотных остатков (не показаны) взаимодействуют с гидрофобными цепями жирных кислот внутри липидного бислоя. Полярные пептидные группы образуют между собой водородные связи (не показаны) и, таким образом, экранируются от гидрофобного окружения бислоя. Представлен фрагмент полипептида из бактериального фотосинтезирующего реакционного центра, изображенного на рис. 6-32. (J. Deisenhofer et al., Nature 318, 618-624, 1985 и H. Michel et al., EMBO J., 5, 1149-1158, 1986.)

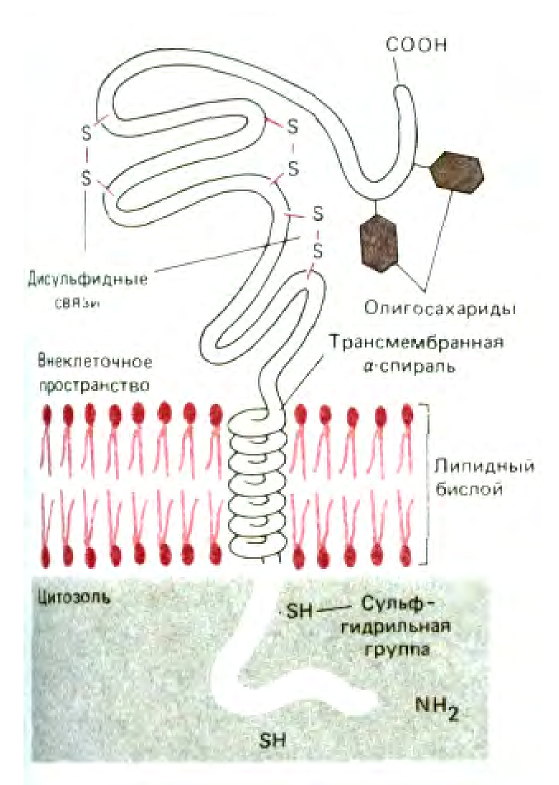


Рис. 6-16. Типичный трансмембранный гликопротеин, пересекающий мембрану 1 раз. Обратите внимание, что полипептидная цепь пронизывает липидный бислой в виде правозакрученной α-спирали, и что олигосахаридные группы и дисульфидные связи в цитоплазматическом домене не образуются из-за восстановительных условий в цитозоле клетки.

Некоторые белки, связанные с мембранами, вовсе не взаимодействуют с гидрофобной внутренностью липидного бислоя. Они соединены с той или другой стороной мембраны за счет нековалентных взаимодействий с другими мембранными белками (пример 5 на рис. 6-14). Многие из них высвобождаются из мембраны в сравнительно мягких условиях, например путем экстракции растворами с очень высокой или низкой ионной силой или растворами с крайними значениями pH, которые влияют на взаимодействия белок-белок, но оставляют интактным липидный бислой. Такие белки называют **периферическими мембранными белками.** Напротив, трансмембранные белки, белки, связанные с фосфатидилинозитолом, и некоторые белки, удерживаемые в бислое с помощью цепи жирной кислоты (так же как и другие, крепко связанные белки, которые могут быть высвобождены только после разрушения бислоя детергентами или органическими растворителями) называются **интегральными мембранными белками.**

Та часть полипептидной цепи трансмембранных белков, которая погружена в гидрофобное окружение липидного бислоя, состоит в основном из аминокислотных остатков с неполярными боковыми группами. Однако, поскольку пептидные группы полярны, а молекулы воды недоступны, все пептидные группы в бислое стремятся образовать водородные связи между собой (см. рис. 3-26). Число водородных связей между пептидными группами оказывается максимальным, если участок полипептидной цепи, проходящей через бислой, образует регулярную α-спираль. Именно так большинство полипептидных цепей пересекает мембрану (рис. 6-15). В тех же случаях, когда через бислой проходит несколько участков полипептидной цепи, пептидные группы могут в принципе быть насыщены водородными связями, если эти участки организованы в виде β-слоев. Однако чаще полипептидная цепь белков, пронизывающих мембрану несколько раз, образует серию α-спиралей, а не β-слоев (пример 2 на рис. 6-14). Строгое условие максимизации числа водородных связей в отсутствие молекул воды (запрет на дегидратацию) означает также, что полипептидная цепь, пронизывающая мембрану, вероятно, не меняет своего первоначального направления до полного пересечения мембраны, поскольку наличие изгиба в цепи привело бы к уменьшению числа регулярных водородных связей. Видимо, по этой причине до сих пор не обнаружено мембранных белков, погруженных в мембранный слой лишь частично.

Трансмембранные белки всегда имеют уникальную ориентацию в липидном бислое. Это отражает асимметричный характер их биосинтеза и встраивания в мембранный бислой эндоплазматического ретикулума, а также различные функции цитоплазматических и внеклеточных доменов этих белков. Основная масса трансмембранных белков гликозилирована. Как и в случае с гликолипидами, олигосахаридные цепи всегда присутствуют на внеклеточной стороне мембраны, поскольку сахарные остатки присоединяются в цистернах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Другая асимметрия заключена в белковых сульфгидрильных группах (SH), которые остаются восстановленными (цистеины) в цитоплазматических доменах, но часто используются для формирования внутри- или межцепных дисульфидных (S — S) связей во внеклеточных доменах (рис. 6-16).

6.2.2. Мембранные белки могут быть растворены и очищены в растворах детергентов [9]

Как правило, трансмембранные белки (и некоторые другие, прочно связанные с мембраной) могут быть солюбилизированы только с помощью реагентов, разрушающих гидрофобные взаимодействия и, в конечном счете, бислой. Наиболее успешно это можно сделать, используя детергенты - небольшие амфипатические молекулы, стремящиеся образовать в воде мицеллы (рис. 6-17). При смешивании детергента с мембраной гидрофобные концы его молекул связываются с гидрофобными участками мембранных белков, вытесняя оттуда молекулы липидов. Поскольку противоположный конец молекулы детергента полярный, такое связывание приводит к тому, что мембранные белки переходят в раствор в виде комплексов с детергентом. Некоторые прочно связанные с белками молекулы липидов также остаются в этих комплексах (рис. 6-18). Полярные концы детергентов могут быть либо заряженными (ионными), как в *додецилсульфате натрия (ДСН),* либо незаряженными (неионными), как в случае *тритонов.* Структуры этих двух используемых повсеместно детергентов изображены на рис. 6-19.

Сильным ионным детергентом типа ДСН можно солюбилизировать даже самые гидрофобные белки мембран. Это позволяет анализировать такие белки методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем ДСН. Разработка данной методики произвела настоящую революцию в изучении мембранных белков. Детергенты такого типа разворачивают (денатурируют) полипептидную цепь белка, внедряясь в его внутреннее «гидрофобное ядро» (см. рис. 3-22). Обычно при этом белки утрачивают активность и становятся непригодными для исследования их функции. Тем не менее белки могут быть легко очищены в денатурированной под действием ДСН форме. В некоторых случаях удаление детергента приводит к ренатурации и восстановлению функциональной активности.

Менее гидрофобные мембранные белки можно солюбилизировать при низких концентрациях мягкого детергента. Это позволяет получить их если не в нативной, то по крайней мере в функционально активной форме. Если же детергент затем удалить в отсутствие фосфолипидов, то мембранные белки обычно агрегируют и выпадают в осадок (рис. 6-20). Однако если очищенные белки смешать с фосфолипидами до удаления детергента, то белки в активной форме обычно встроятся в липидный бислой, формируемый молекулами фосфолипидов (рис. 6-21). Таким образом можно реконструировать функционально активные системы мембранных белков из очищенных компонентов. Это один из возможных подходов к изучению их функциональной активности. Например, если удается показать, что очищенный белок перекачивает ионы через

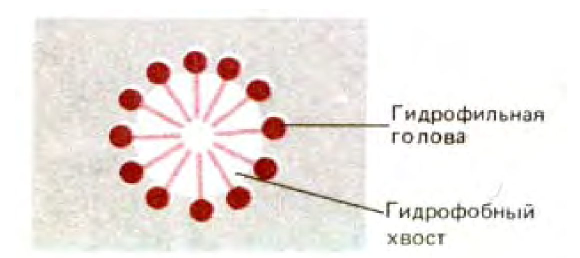


Рис. 6-17. Поперечный разрез мицеллы, образовавшейся в воде из молекул детергента. Молекулы детергента являются амфипатическими, поскольку имеют полярный и неполярный концы.

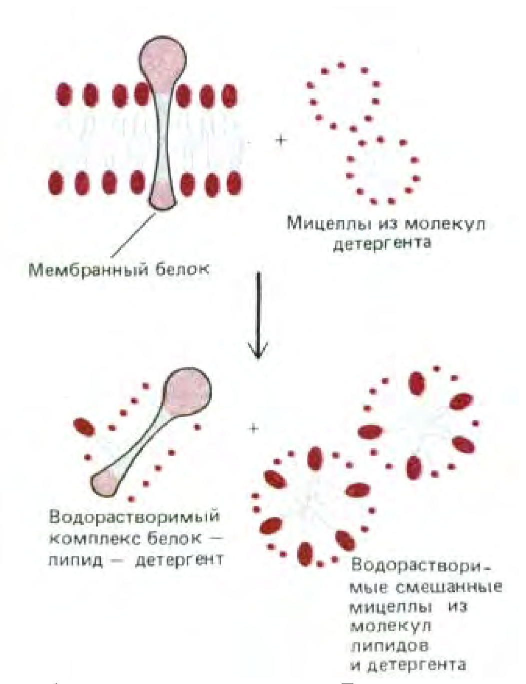


Рис. 6-18. Солюбилизация мембранных белков с помощью детергента. Детергент разрушает липидный бислой, в результате чего белки оказываются в растворе в виде комплексов с молекулами липидов и детергента. Фосфолипиды мембран также солюбилизируются с помощью детергента.

Додецилсульфат натрия (ДСН)

Тритон Х-100

Рис. 6-19. Структуры молекул двух широко распространенных детергентов: додецилсульфата натрия (ДСН, анионного детергента) и тритона Х-100 (неионного детергента). Заметьте, что участок в скобках повторяется семь раз.

синтетический липидный бислой в отсутствие других белков, можно со всей определенностью сказать, что это ионный насос. Более того, контролируя в экспериментах условия реакции (доступность белков для АТР и ионов), можно выяснить детальный механизм действия этого белка (см. разд. 6.4.4).

6-12

6.2.3. Поверхность мембранных белков, обращенную к цитоплазме, можно изучать на примере «теней» эритроцитов [10]

О плазматической мембране эритроцитов человека (рис. 6-22) известно гораздо больше, чем о любой другой мембране эукариотической клетки. Такая ситуация сложилась вследствие ряда причин. 1) Эритроциты можно получать в большом количестве (например, из банков крови). При этом они практически не загрязнены клетками других типов. 2) Поскольку эритроциты не имеют ядра и внутренних органелл, их плазматическая мембрана - это единственная мембрана данных клеток и ее можно выделить в чистом виде, без примеси внутренних мембран. Между тем при получении плазматической мембраны из клеток других типов, в которых она обычно составляет менее 5% от массы всех мембран (см. табл. 8-2), это представляет серьезную проблему. 3) Мембраны эритроцитов, или *«тени»* (пустые оболочки), легко получить, поместив клетки в гипотетический солевой раствор. Концентрация соли в таком растворе ниже, чем в клетке, поэтому вода устремляется внутрь эритроцитов, заставляя их разбухать и лопаться (лизис), высвобождая гемоглобин (главный немембранный белок). 4) Мембранные «тени» можно изучать как в поврежденном виде (в этом случае реагенты взаимодействуют с молекулами на обеих сторонах мембраны), так и после самопроизвольного восстановления их целостности, когда водорастворимые реагенты не могут проникать во внутреннее пространство. Кроме того, из теней эритроцитов можно получить замкнутые, вывернутые наизнанку пузырьки (рис. 6-23); это дает возможность изучать независимо друг от друга внешнюю и внутреннюю (цитоплазматическую) стороны мембраны. Использование теней эритроцитов с разрывами и без разрывов впервые позволило установить, что некоторые мембранные белки пронизывают липидный бислой (см. ниже), и что состав липидов на двух сторонах бислоя различен. Как и в большинстве основных принципов, первоначально установленных при изучении мембран эритроцитов, эти факты постепенно были подтверждены и при изучении мембран ядерных клеток.

Характер расположения в мембране того или иного белка можно определить несколькими способами. Один из них основан на том, что меченные (флуоресцентными красителями или радиоактивными изотопами) водорастворимые реагенты не способны проникать через мембрану и поэтому ковалентно связываются со специфическими группами только на ее наружной стороне. После этого мембраны растворяют, белки разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, а меченые белки идентифицируют либо по радиоактивности (радиоавтография гелей), либо по флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Используя такое *направленное мечение,* можно определить, как конкретный белок (полоса в геле) ориентирован в мембране: если он метится одновременно и на внешней стороне (вместе с нативными клетками и тенями без разрывов), и на цитоплазматической стороне (вместе с замкнутыми вывернутыми наизнанку пузырьками), то это, несомненно, трансмембранный белок. Альтернативный подход состоит в обработке либо наружной, либо внутренней поверхности мембраны не проникающими через нее протеолитическими ферментами: если какой-



Рис. 6-20. Схема, показывающая, что при удалении детергента из солюбилизированных с его помощью мембранных белков, почти не защищенные от контактов с водой гидрофобные участки на поверхности белков стремятся взаимодействовать друг с другом, в результате чего образуются большие агрегаты белков, осаждающиеся из раствора.

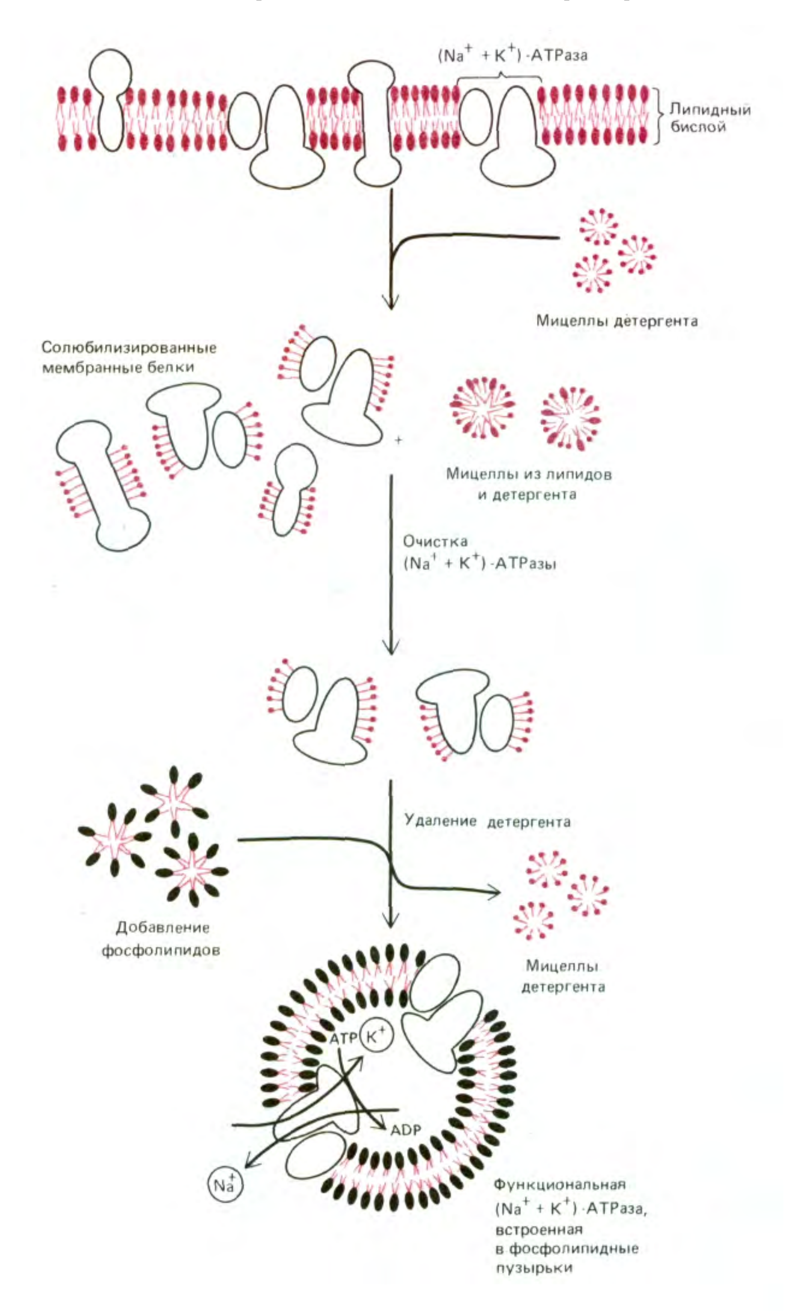


Рис. 6-21. Солюбилизация, очистка и реконструкция функциональных молекул $(Na^+ + K^+)$-АТРазы в фосфолипидных пузырьках $(Na^+ + K^+)$-АТРаза - это анионный насос, присутствующий в плазматических мембранах большинства животных клеток. Он использует энергию гидролиза АТР для перекачки ионов Na^+ из клетки, а K^+ внутрь клетки. Реконструкция проводится в присутствии высоких концентраций Na^+ и АТР, так как АТРаза функционирует в качестве насоса только при достаточной концентрации этих веществ внутри пузырьков. Детергент удаляется продолжительным диализом или с помощью хроматографии.

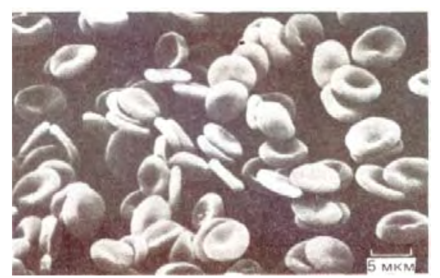


Рис. 6-22. Микрофотография эритроцитов человека, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Клетки имеют двояковогнутую форму и не содержат ядер. (С любезного разрешения Barnadette Chialley.)

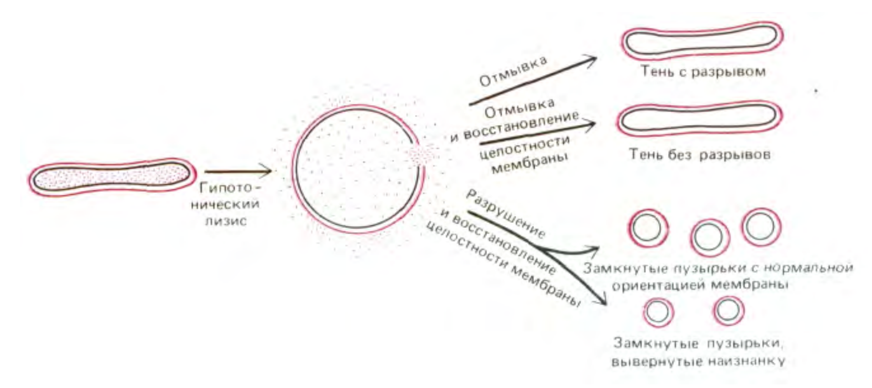


Рис. 6-23. Получение теней эритроцитов с разрывами и без разрывов, а также замкнутых пузырьков с правильной ориентацией бислоя и вывернутых наизнанку. Показано, что эритроциты разрываются только в одном месте, давая тени с единственным отверстием. Маленькие пузырьки получаются при механическом разрушении теней. Ориентация мембран в пузырьках определяется ионными условиями во время процедуры разрушения.



Рис. 6-24. Картина, полученная при электрофорезе белков, входящих в состав мембраны эритроцитов человека, в присутствии ДСН. Окрашивание проводилось кумасси синим *(А)*. Положение в геле некоторых белков *(Б);* полоса, соответствующая гликофорину, выделена цветом для облегчения её идентификации вблизи полосы 3. Другие полосы в геле на рисунке опущены. Многочисленные углеводные остатки в гликофорине замедляют движение молекул этого белка настолько, что они движутся почти так же, как значительно более крупные молекулы полосы 3. (С любезного разрешения Ted Steck.)

либо белок частично расщепляется в обоих случаях, то он должен быть трансмембранным. Кроме того, с помощью меченых антител можно определить, на какой стороне мембраны находится специфическая часть трансмембранного белка.

При изучении белков плазматической мембраны эритроцитов человека методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН удается идентифицировать около 15 главных белков с молекулярной массой от 15000 до 250000. Три из них - *спектрин, гликофорин* и так называемая *полоса 3*- составляют в сумме более 60% (по весу) всех мембранных белков (рис. 6-24). Все три белка связываются с мембраной по-разному. Поэтому мы рассмотрим данные белки в качестве примеров трех главных способов ассоциации белков с мембранами.

6-14

6.2.4. Спектрин - белок цитоскелета, нековалентно связанный с цитоплазматической стороной мембраны эритроцитов [11]

Большинство мембранных белков эритроцитов человека - это периферические мембранные белки, ассоциированные с бислоем на его плазматической стороне. Самый распространенный из таких белков **спектрин** представляет собой длинную, тонкую, гибкую «палочку» длиной около 100 нм. Его масса составляет около 25% массы мембранных белков, что соответствует 2,5 x 10^5 копий на клетку. Спектрин является важным компонентом белковой *сети (цитоскелета),* поддерживающей структурную целостность и двояковогнутую форму эритроцитов (см. рис. 6-22). Если цитоскелет экстрагировать из теней эритроцитов растворами с низкой ионной силой, мембрана фрагментируется на мелкие пузырьки.



Рис. 6-25. Молекулы спектрина из эритроцитов человека. *А.* Схематическое изображение. *Б.* Электронная микрофотография. Каждый гетеродимер состоит из двух антипараллельных слегка перекрученных друг с другом, гибких полипептидных цепей, которые нековалентно взаимодействуют во множестве точек, включая оба конца. Фосфорилированная «головка» - место, где объединяются два димера, образуя тетрамер, расположена слева. Каждая из а и (3 цепей состоит из большого числа повторяющихся доменов, длиной 106 аминокислотных остатков. Предполагают, что каждый домен организован группой из трех α-спиралей (не показано), связанных нерегулярными перетяжками. На *(Б)* показаны спектриновые молекулы, оттененные платиной. *(A-D.* W. Speicher и V.T. Marcher, Nature 311, 177-180; *Б - с* любезного разрешения D. M. Shotten et al., J. Mol. Biol., 131, 303-329, 1979. Academic Press Inc. (London) Ltd.)

Молекула спектрина состоит из двух больших полипептидных цепей: α-спектрина (около 240 000 дальтон) и β-спектрина (около 220 000 даль-тон). По-видимому, каждая цепь должна быть построена из множества α-спиральных сегментов, объединенных в группы по три и связанных между собой неспиральными участками (рис. 6-25). Такие спектриновые гетеродимеры самопроизвольно агрегируют (голова к голове), образуя тетрамеры длиной 200 нм. Концы пяти или шести тетрамеров соединяются между собой, связываясь с короткими активными филаментами и с другим белком *(полосой 4.1),* в так называемый «узловой комплекс». Таким образом, образуется гибкая сетеподобная структура на цитоплазматической поверхности мембраны (рис. 6-26). Именно цитоскелет, в основу которого входит спектрин, позволяет эритроцитам противостоять давлению на мембрану при прохождении через узкие капилляры. У анемичных мышей и людей с наследственной аномалией спектрина эритроциты имеют сферическую (а не двояковогнутую) форму и повышенную хрупкость. Степень тяжести анемии прямо пропорциональна степени недостаточности спектрина.

При связывании радиоактивно меченного спектрина с мембранами эритроцитов, из которых предварительно был удален спектрин и некоторые другие периферические белки, удалось идентифицировать белок, ответственный за соединение спектринового цитоскелета с плазматической мембраной. Крупный внутриклеточный белок был назван анкирином. Он связывал как β-спектрин, так и цитоплазматический домен трансмембранного белка полосы 3 (см. рис. 6-26). Соединяя белок полосы 3 со спектрином, анкирин связывал сеть, образуемую спектрином, с мембраной. При этом сильно уменьшалась скорость диффузии молекул белка полосы 3 в липидном бислое. Однако цитоскелет на основе спектрина может соединяться с мембраной и по другому механизму. Было показано, что цитоскелетный белок полосы 4.1 (который

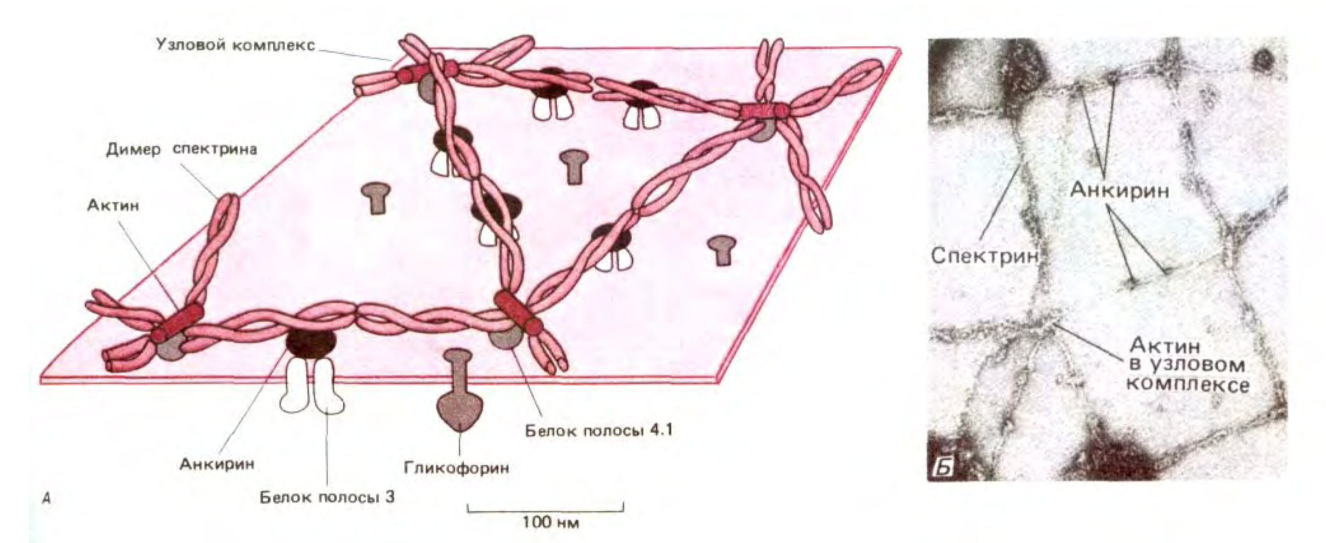


Рис. 6-26. Схематическое изображение *(А)* и электронная микрофотография (*Б*) цитоскелета (на основе спектрина) на цитоплазматической поверхности мембраны эритроцитов человека. Структура, представленная на *(А),* вытекает главным образом из исследований взаимодействия очищенных белков in vitro. Спектриновые димеры ассоциируют «голова к голове», образуя тетрамеры, которые объединяются с помощью коротких актиновых филаментов (содержащих 15 мономеров) и белка полосы 4.1 (а два или три других белка не показаны), в результате чего образуется сеть. Эта цитоскелетная сеть связана с мембраной благодаря взаимодействию спектриновых тетрамеров с молекулами белка полосы 3, но не прямо, а через молекулы анкирина. Она может также связываться с мембраной при взаимодействии белка полосы 4.1 с молекулами гликофорина (не показано). Электронная микрофотография демонстрирует эритроциты после фиксации и негативного контрастирования. Спектриновая сеть была специально растянута, для того чтобы были видны отдельные детали структуры; в нормальной клетке такая сеть занимает лишь 1/10 изображенной площади. (С любезного разрешения T. Byers и D. Branton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6153-6157, 1985.)

связывает спектрин и актин) соединяется с цитоплазматическим доменом гликофорина, другого трансмембранного белка эритроцитов.

Аналогичные, но гораздо более совершенные и сложные цитоскелетные сети лежат в основе плазматических мембран ядерных клеток. Такие сети, состоящие из кортикальных областей (или *кортексов)* цитоплазмы, содержат множество актиновых филаментов, которые, по-видимому, соединены с плазматическими мембранами несколькими различными способами. В кортексе обнаружены белки, структурно гомологичные спектрину, анкирину и белку полосы 4.1, но их организация и функции до сих пор не поняты.

6.2.5. Гликофорин пронизывает липидный бислой в виде одиночной α-спирали [11]

Гликофорин - это один из двух главных белков, выступающих не внешней поверхности эритроцитов человека. Он оказался первым мембранным белком, для которого была определена полная аминокислотная последовательность. Гликофорин представляет собой небольшой трансмембранный гликопротеин (131 аминокислотный остаток). Большая часть массы этого белка находится на наружной поверхности

мембраны, где локализован и его гидрофильный N-концевой участок. С этой областью белковой молекулы связаны 15 отдельных олигосахаридных боковых цепей, в которых в сумме содержится около 100 сахарных остатков, что составляет примерно 60% массы молекулы гликопротеина. Фактически подавляющую часть углеводов клеточной поверхности (включая более 90% сиаловой кислоты) и, следовательно, большую часть всех отрицательных зарядов клеточной поверхности несут на себе молекулы гликофорина. Гидрофильные С-концевые хвосты этих молекул погружены в цитозоль, а гидрофобный α-спиральный участок, насчитывающий приблизительно 20 аминокислотных остатков, пронизывает липидный бислой.

Несмотря на то что в клетках содержится много молекул гликофорина (более 6 x 10^5), их функция остается неизвестной. Более того, люди, в эритроцитах которых отсутствует большинство этих молекул, производят впечатление совершенно здоровых. Гликофорин обнаружен только в эритроцитах, однако в структурном отношении его можно отнести к общему классу мембранных гликопротеинов, пронизывающих липидный бислой в виде одиночной α-спирали (см. пример 1 на рис. 6-14 и рис. 6-16). Различные рецепторы на поверхности клеток принадлежат именно к этому классу белков.

6-14

6.2.6. Полоса 3 из мембраны эритроцитов человека представляет собой белок, транспортирующий анионы [13]

О белке полосы 3 известно (в отличие от гликофорина), что он играет важную роль в функционировании клетки. Этот белок называется полосой 3, поскольку при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДСН он занимает соответствующее положение относительно других белков (см. рис. 6-24). Как и гликофорин, полоса 3 является трансмембранным белком. Однако в отличие от него этот белок имеет глобулярную конформацию, а его полипептидная цепь (длиной около 930 аминокислотных остатков) пересекает бислой по крайней мере 10 раз. Каждый эритроцит содержит около 10^6 молекул белка полосы 3, которые, по-видимому, образуют в мембране димеры и, возможно, тетрамеры.

Основная функция эритроцитов, как известно, заключается в переносе O_2 из легких ко всем тканям и CO_2 из тканей к легким. Белок полосы 3 принимает участие в этом обмене. Находясь в легких, эритроциты избавляются от CO_2, аккумулированного в тканях, путем замены ионов HCO_3^- на Cl^-. В мембране есть специальный анионный транспортный белок для осуществления данного процесса. Газообмен можно заблокировать специфическим ингибитором, связывающимся с транспортным белком. При использовании ингибиторов, меченных радиоактивными изотопами, этот анионный транспортный белок был идентифицирован. Им оказался белок полосы 3. Совсем недавно процесс анионного транспорта был реконструирован in vitro с использованием очищенного белка полосы 3, встроенного в фосфолипидные пузырьки. Очень похожие анионные транспортные белки были обнаружены и во многих других ядерных клетках, где они помогают контролировать внутриклеточный pH.

Белок полосы 3 можно зарегистрировать в виде внутримембранных частиц с помощью электронной микроскопии в сочетании с замораживанием - скалыванием. В этом случае клетки замораживают в жидком азоте и полученный кусочек льда раскалывают острым ножом. Плоскость скола обычно проходит через гидрофобную сердцевину мембранного бислоя, разделяя его на два монослоя. Затем на образовавшиеся поверхности напыляют платину и рассматривают платиновые реплики



Рис. 6-27. *Схема, показывающая, как с помощью электронной микроскопии образцов, приготовленных методом замораживания - скалывания, можно получить изображения внутренней гидрофобной поверхности цитоплазматической (или протоплазматической) половины бислоя (называемой Р-поверхностью) и наружной половины бислоя (называемой Е-поверхностью). После показанного здесь процесса скалывания открытые поверхности сколов оттеняют платиной и углеродом, органические вещества удаляют, а полученную платиновую реплику рассматривают в электронный микроскоп (см. также рис. 4-23).*



Рис. 6-28. Электронная микрофотография скола эритроцитов человека. Обратите внимание, что плотность внутримембранных частиц на цитоплазматической (Р) поверхности выше, чем на наружной (Е). (С любезного разрешения L. Engstrom и D. Branton.)

в электронный микроскоп. С помощью этой методики открываются (рис. 6-27) две различные гидрофобные внутренние поверхности: цитоплазматической (или протоплазматической) половины бислоя (Р-поверхность) и внешней половины бислоя (Е-поверхность, от англ. external). Мембраны человеческих эритроцитов в таких препаратах выглядят усеянными относительно гомогенными по размеру (7.5 нм в диаметре) внутримембранными частицами. Как оказалось, их больше на Р-поверхности, чем на Е-поверхности (рис. 6-28). По-видимому, это главным образом белки полосы 3, поскольку такие же частицы обнаружены при скалывании синтетических липидных бислоев, реконструированных вместе с белком полосы 3. Рис. 6-29 убеждает нас в том, что именно молекулы белка полосы 3, а не молекулы гликофорина, видны на электронных микрофотографиях мембран эритроцитов, полученных с помощью метода замораживания - скалывания. Ведь нетрудно себе представить, каким образом трансмембранный белок, такой, например, как белок полосы 3, основная масса которого расположена в пределах липидного бислоя, может осуществлять пассивный транспорт полярных молекул через неполярный бислой. Ясно, что белок полосы 3 (или его

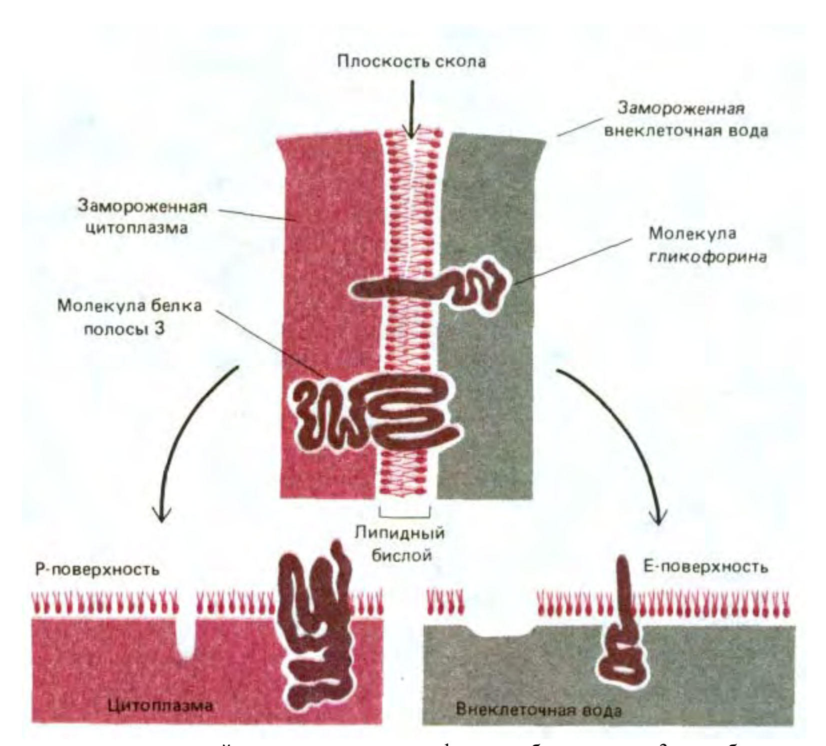


Рис. 6-29. Схема, показывающая, что может произойти с молекулами гликофорина и белка полосы 3 в мембранах эритроцитов человека во время процедуры замораживания - скалывания. При расщеплении липидного бислоя из замороженного монослоя выдергивается либо внутренняя, либо внешняя половина трансмембранного белка. Преимущественно белки остаются на той половине, с которой ассоциирована более крупная часть белковой молекулы. Поэтому молекулы белка полосы 3 обычно остаются на внутренней (Р) поверхности скола. Поскольку при этом над поверхностью скола экспонирована достаточно большая часть белка, они видны на микрофотографиях в виде внутримембранных частиц. Молекулы гликофорина обычно остаются на внешней (Е) поверхности скола, но их экспонированных цитоплазматических хвостов не хватает для того, чтобы создать изображение каких-либо четко различимых частиц.

димер либо тетрамер) способен обеспечить трансмембранный гидрофильный проход, по которому ионы C^- и HCO_3^- переносятся без контакта с гидрофобным окружением липидного бислоя (см. рис. 6-43, *А).* Маловероятно, что подобный транспорт может осуществлять молекула гликофорина, пронизывающая бислой в виде простой α-спирали. Для того чтобы понять механизм функционирования мембранных транспортных белков, необходима точная информация об их трехмерной структуре в составе бислоя. Первым транспортным белком, для которого подобные детали стали известны, оказался *бактериородопсин* - белок, работающий как фотоактивируемый протонный (H^+) насос в плазматической мембране некоторых бактерий. Структура бактериородопсина аналогична структуре других мембранных белков. Этот белок заслуживает того, чтобы остановится на нем поподробнее.

6.2.7. Бактериородопсин - это протонный насос, пронизывающий бислой в виде семи α-спиралей [14]

«Пурпурная мембрана» бактерий *Holobacterium halobium* - это четко очерченный участок (пятно) неправильной формы на плазматической мембране (рис. 6-30), которая содержит молекулы одного белка **- бактериородопсина,** В каждой молекуле имеется одна поглощающая свет простетическая группа, или хромофор (называемый *ретиналем),* родственная витамину А и идентичная хромофору, обнаруженному в родопсине палочек сетчатки глаза у позвоночных (см. разд. 19.6.6). Ретиналь ковалентно связан с боковой цепью лизина в белке. При активации одним квантом света возбужденный хромофор вызывает конформационные изменения в белке, в результате чего два протона переносятся с внутренней поверхности клетки на наружную. Вследствие такого переноса в клетке создается градиент концентрации протонов и градиент электрического потенциала, которые в свою очередь обусловливают синтез АТР с помощью второго белка клеточной плазматической мембраны.

Молекулы родопсина образуют в клеточной мембране плоскую кристаллическую решетку, подобную двумерному кристаллу. Сочетание методов электронной микроскопии низкой интенсивности и малоуглового рассеяния электронов позволило определить трехмерную структуру белка и его ориентацию в мембране с разрешением 0,7 нм. Последний метод аналогичен рентгеноструктурному анализу, который используется для получения трехмерных кристаллов растворимых белков. Изучение бактериородопсина показало, что его молекула состоит из семи α-спиралей (каждая из которых содержит около 25 аминокислотных остатков), плотно упакованных друг с другом (рис. 6-31). Эти спирали пересекают линейный бислой примерно под прямым углом к плоскости мембраны. Весьма возможно, что протоны проходят через мембрану при участии хромофора по сопряженной системе боковых цепей α-спиралей, однако детальные механизмы этого процесса еще неизвестны.

Бактериородопсин относится к семейству мембранных белков, обладающих сходной структурой, но различными функциями. Например, рецептор света - белок *родопсин* - в палочках сетчатки глаза позвоночных и некоторые другие белки-рецепторы клеточной поверхности, связывающие специфические гормоны, также уложены в виде семи трансмембранных α-спиралей. Эти белки функционируют скорее как переносчики сигнала, чем как транспортные белки, поскольку каждый из них в ответ на внешний сигнал активирует другой белок плазматической мембраны, который генерирует химический сигнал в цитозоле.

Для полного понимания механизмов функционирования бактериородопсина необходимо определить точное положение всех его атомов



Рис. 6-30. Схематическое изображение бактерии *Halobacterium halobium,* показывающее пятна пурпурной мембраны, содержащей молекулы бактериородопсина. У этих бактерий, живущих в солнечных озерах и получающих много солнечного света, в процессе эволюции появились разнообразные белки, активируемые светом, в том числе и бактериородопсин - фотоактивируемый протонный насос плазматической мембраны.

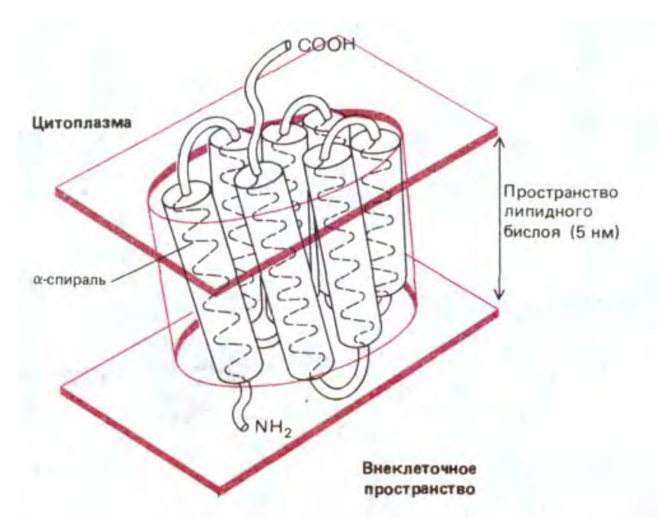


Рис. 6-31. Структура молекулы родопсина и ее расположение в липидном бислое. Полипептидная цепь пересекает бислой в виде семи α-спиралей. (По данным R. Henderson и R.N.T. Onwin, Nature, 257, 28-32, 1975.)

методами рентгеноструктурного анализа кристаллов белка. Однако из-за амфипатической природы мембранных белков их чрезвычайно трудно кристаллизовать. Это удалось сделать лишь в 1985 году при изучении фотосинтезирующего реакционного центра у бактерий методами рентгеноструктурного анализа. Впервые было показано, как множество полипептидов могут ассоциировать в мембране, образуя сложную белковую машину.

6.2.8. Четыре различных полипептидных цепи в мембраносвязанном комплексе образуют фотосинтезирующий реакционный центр у бактерий [15]

В гл. 3 шла речь о том, что различные полипептиды ассоциируют, образуя большие мультиферментные комплексы, которые с высокой эффективностью катализируют сложные реакции благодаря кооперативной работе субъединиц. Аналогичные комплексы белков обнаружены и в мембранах. Наиболее изучен среди них **бактериальный фотосинтезирующий реакционный центр.** Этот белковый комплекс находится в плазматической мембране пурпурных фотосинтезирующих бактерий *Rhodopseudomonas viridis.* Он использует поглощенную энергию света для создания электрона с высокой энергией, позволяющей ему пересекать мембрану быстрее чем за наносекунду. Затем электрон переходит к другим переносчикам электронов, находящимся в мембране, которые используют часть энергии, высвобождаемой в процессе электронного транспорта для синтеза АТР в цитозоле. Реакционный центр построен из четырех различных полипептидов: L, М, Н и цитохрома. Для изучения трехмерной пространственной структуры этот комплекс был солюбилизирован в растворе детергента, закристаллизован в виде комплекса белков с детергентом и изучен методом рентгеноструктурного анализа. Как оказалось, реакционный центр содержит четыре молекулы хлорофилла и восемь других коферментов, переносящих электроны. В гл. 7 мы будем говорить о том, что для понимания фотосинтеза очень важным оказалось установление точного положения каждого из коферментов в комплексе. Не менее значимым (в большой степени относящимся к теме данной главы) событием стало выяснение организации четырех белковых субъединиц в трансмембранном комплексе. Субъединицы L и М гомологичны и состоят каждая из пяти α-спиралей, пронизывающих липидный бислой плазматической мембраны (рис. 6-32). Эти две субъединицы образуют гетеродимер, представляющий собой ядро реак-

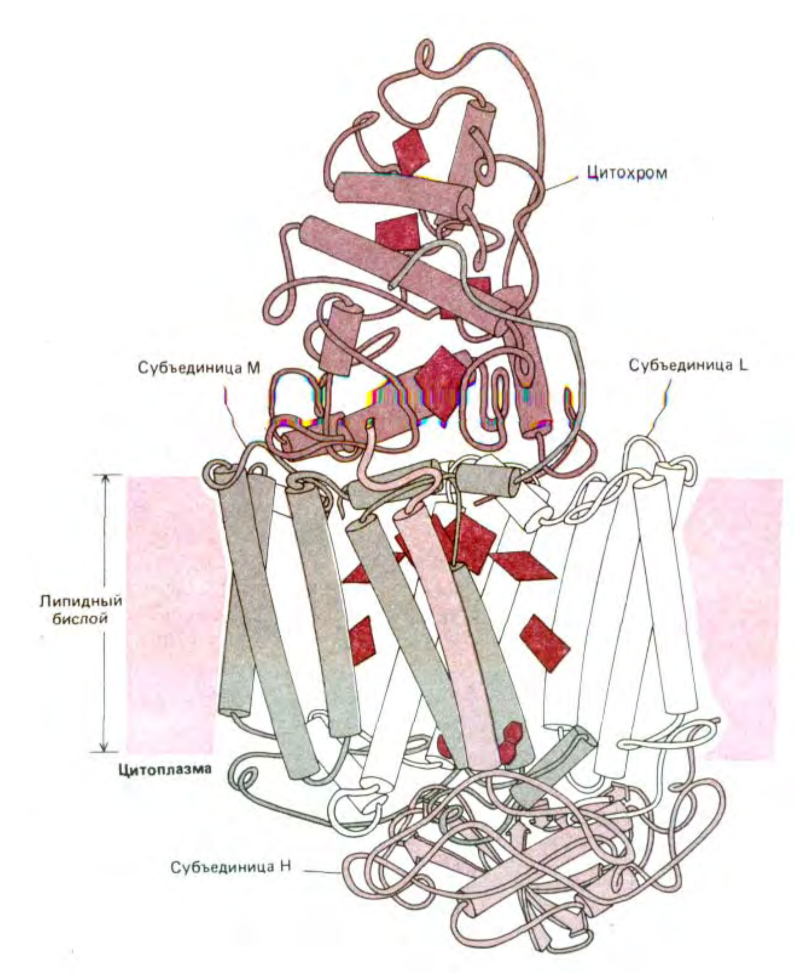


Рис. 6-32. Структура фотосинтезирующего реакционного центра бактерий *Rhodopseudomonas viridis* по данным рентгеноструктурного анализа кристаллов трансмембранного белкового комплекса. Белковый комплекс состоит из четырех субъединиц: L, M, H и цитохрома. Субъединицы L и M образуют ядро реакционного центра. Каждая из субъединиц L и M содержит по 5 α-спиралей, пересекающих бислой. Положение коферментов-переносчиков электронов показано цветом. (Изображено J. Richardson по работе Deisenhafer et al. Nature. 318, 618-624, 1985.)

ционного центра: 10 его α-спиралей окружают переносчиков электрона. Субъединица H имеет лишь одну трансмембранную α-спираль, а остальная часть полипептидной цепи уложена в виде глобулярного домена, находящегося на цитоплазматической стороне мембраны, где он связан с L-M-гетеродимером. Цитохром представляет собой периферический мембранный белок, связанный с гетеродимером L-H на внешней стороне мембраны (см. рис. 6-32).

Две «дополнительных» субъединицы (H и цитохром) сильно увеличивают эффективность фотосинтетической реакции, катализируемой, в общем-то, гетеродимером L-M: цитохром снабжает гетеродимер электронами, а субъединица H предположительно объединяет реакционный центр со множеством белков. Гетеродимер L-M эволюционно оказался очень консервативным белком, по-видимому, пара тесно связанных между собой белков образует ядро одного из фотосинтезирующих реакционных центров в зеленых растениях.

6-15

6.2.9. Многие мембранные белки диффундируют в плоскости мембраны [16]

Мембранные белки так же, как и мембранные липиды, не могут перескакивать с одной стороны бислоя на другую (такой перескок носит

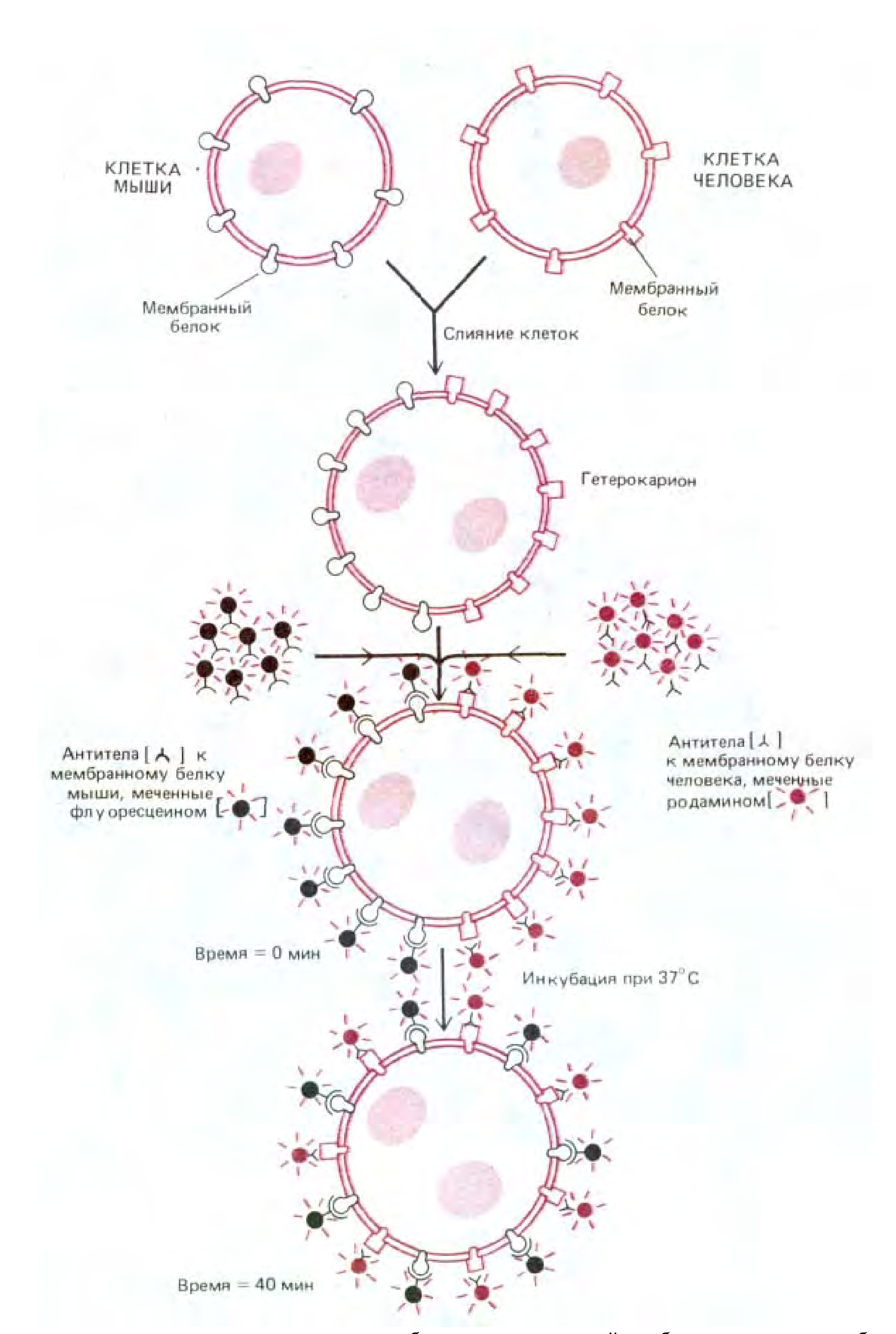


Рис. 6-33. Схема эксперимента, демонстрирующего перемешивание белков плазматической мембраны в клеточных гибридах мышь-человек. Белки мыши и человека первоначально располагаются на своих собственных половинах новообразованной плазматической мембраны гетерокариона, но со временем перемешиваются. Для визуализации белков использовали два вида антител, меченных разными лигандами. (В флуоресцентном микроскопе флуоресцеин имеет зеленый цвет, а родамин - красный.) (По данным L. D. Frye и M. Edidin, J. Cell. Sci., 7, 319-335, 1970, с разрешения The Company of Biologists.)

название *флип-флоп),* но они способны вращаться вокруг оси, перпендикулярной плоскости бислоя *(вращательная диффузия).* К тому же многие мембранные белки могут перемещаться в плоскости мембраны *(латеральная диффузия).* То, что некоторые белки плазматической мембраны способны передвигаться в плоскости бислоя, было впервые прямо показано в 1970 г. с помощью экспериментов на гибридных клетках *(гетерокарионах),* полученных искусственным путем в результате слияния клеток мыши и человека. Для того чтобы различить белки плазматических мембран мыши и человека, были использованы две группы меченых антител. Первоначально мышиные и человеческие белки располагались только в своих областях гетерокариона. Однако примерно за полчаса оба набора белков диффундировали и распространялись по всей поверхности клетки (рис. 6-33). Еще более убедительные доказательства подвижности мембранных белков были получены благодаря открытию процесса, названного *пэтчингом* (см. разд. 6.5.13). Суть этого феномена заключается в следующем. Если белки клеточной поверхности «сшить» с помощью антител, они собираются в большие кластеры, образуя на

поверхности клетки дискретные зоны неправильной формы (пэтчи, от англ. patch). Однако, чтобы антитела могли «сшить» мембранные белки в большие комплексы, эти белки должны свободно перемещаться в плоскости бислоя.

Скорость латеральной диффузии можно измерить с помощью метода *восстановления флуоресценции после ее угашения светом (FRAP,* от англ. fluorescence recovery after photobleaching.) Впервые этот метод использовали для измерения скорости диффузии индивидуальных молекул родопсина в мембранах дисков, присутствующих в палочках сетчатки глаза у позвоночных. Как мы уже говорили, родопсин имеет структуру, сходную со структурой бактериородопсина и содержит такую же хромофорную группу-ретиналь. Диффузия молекул родопсина может быть измерена следующим образом. В молекулах родопсина, находящихся на одной стороне палочки, с помощью хорошо сфокусированного луча света большой интенсивности обесцвечивают хромофор, а затем измеряют время, в течение которого обесцвеченные молекулы перемешиваются с необесцвеченными за счет диффузии (рис. 6-34), Скорость диффузии (или *коэффициент диффузии, D)* оказалась равной примерно 5 х 10^{-9} $см^2$ $с^{-1}$. Это в 2 раза меньше коэффициента диффузии в мембране молекул фосфолипидов (см. разд. 6.1.2) и одновременно - наибольший коэффициент среди всех известных мембранных белков.

Эту же технику использовали для изучения мембранных белков, не содержащих хромофоров. Вначале к таким белкам присоединяли флуоресцентные лиганды. Обычно для этой цели брали флуоресцентно меченные моновалентные антитела (т. е. фрагменты антител с одним участком связывания антигена и, следовательно, неспособных к сшиванию соседних молекул). Затем эти привязанные лиганды обесцвечивали лазерным лучом, после чего измеряли время, необходимое для того, чтобы мембранные белки, несущие необесцвеченные антитела, переместились путем диффузии в обесцвеченную область (рис. 6-35). Измеренные таким образом скорости диффузии различных гликопротеинов плазматической мембраны обычно оказывались по крайней мере в 5-50 раз меньше, чем у молекул родопсина. Относительно низкие скорости диффузии не являются свойством, внутренне присущим индивидуаль-

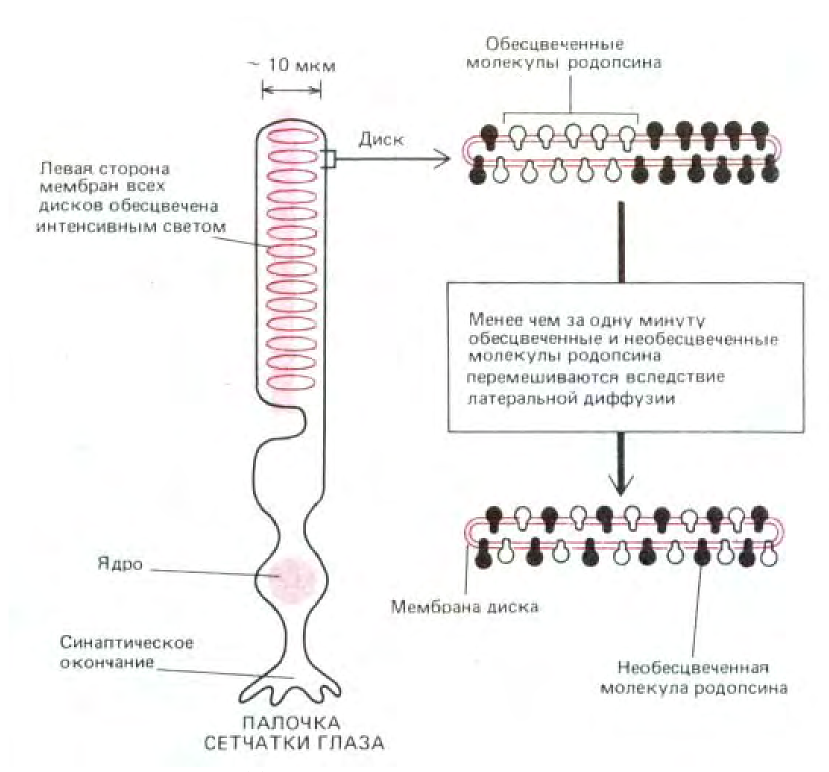


Рис. 6-34. Измерение скорости латеральной диффузии молекул родопсина в мембранах дисков палочки сетчатки. Хромофоры родопсиновых молекул обесцвечиваются на одной стороне клетки; затем измеряется скорость, с которой обесцвеченные и необесцвеченные молекулы родопсина перемешиваются при диффузии. (По данным M. Poo и R.A. Cone, Nature, 247, 438-441, 1974.)

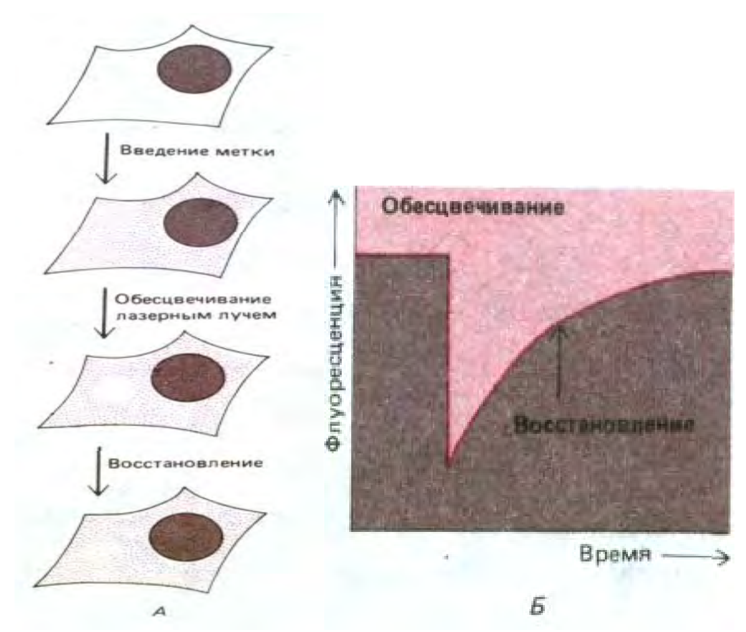


Рис. 6-35. Измерение скорости латеральной диффузии гликопротеина плазматической мембраны. *А.* Специфический гликопротеин метят флуоресцирующим моновалентным антителом, связывающим только этот белок. После обесцвечивания антител лазерным лучом малого сечения измеряют восстановление интенсивности флуоресценции за счет диффузии обесцвеченных молекул *из,* а необесцвеченных в область облучения. *Б.* График, показывающий скорость восстановления флуоресценции. Чем больше коэффициент диффузии мембранного гликопротеина, тем быстрее происходит восстановление.

ным молекулам гликопротеинов, поскольку эти же молекулы гликопротеинов в реконструированных синтетических бислоях диффундируют гораздо быстрее. Истинная причина низких скоростей диффузии при измерении методом FRAP для гликопротеинов плазматической мембраны остается неясной. Одно из возможных объяснений заключается в том, что объемные полисахаридные цепи внеклеточных доменов этих молекул взаимодействуют с цепями олигосахаридов других мембранных гликопротеинов, обусловливая медленную диффузию. По крайней мере в некоторых случаях удаление углеводных цепей сильно увеличивало скорость диффузии белков.

6.2.10. Клетки могут объединять белки и липиды в специфические домены на мембране [17]

Значительным шагом вперед в понимании структуры и функции мембран следует считать осознание того, что биологические мембраны - это двумерные жидкости. Однако ясно, что представление о мембране как о липидном море, в котором свободно плавают белки, оказалось сильно упрощенным. Многие клетки обладают способностью удерживать мембранные белки в специфических доменах в непрерывном липидном бислое. Например, в эпителиальных клетках, выстилающих кишечник или почечные канальцы, некоторые ферменты плазматической мембраны и транспортные белки располагаются только на апикальной поверхности клеток, тогда как другие - только на базальной и латеральной (рис. 6-36). Такое асимметричное распределение мембранных белков существенно для функционирования эпителия (мы обсудим это позже, см. разд. 6.4.11). Липидный состав этих двух мембранных доменов также различен, что указывает на то, что эпителиальные клетки могут ограничивать диффузию между доменами как молекул белка, так и молекул липидов (хотя эксперименты с мечеными молекулами липидов наводят на мысль, что это справедливо лишь для липидных молекул внешнего монослоя мембраны). Такое пространственное разделение белков и липидов, по-видимому, поддерживается (по крайней мере частично) благо-

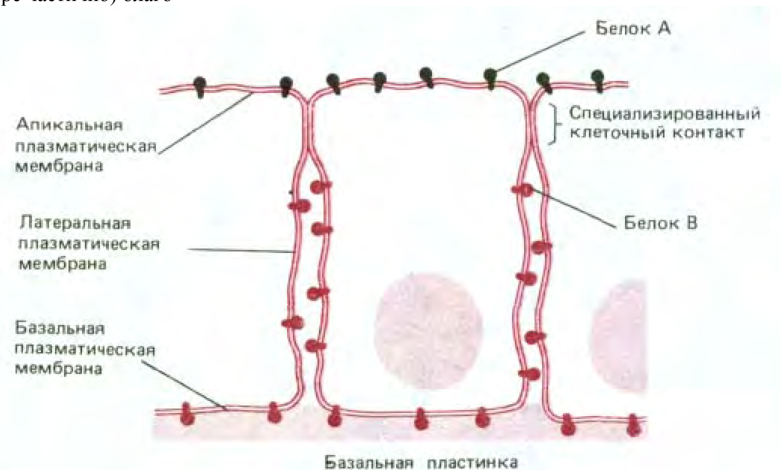


Рис. 6-36. Схематическое изображение клетки эпителия, показывающее, каким образом может ограничиваться область распределения различных белков в плазматической мембране. Белки А (в апикальной мембране) и В (в базальной и латеральной мембранах) способны латерально диффундировать только в пределах соответствующих областей мембраны, а проникнуть в другие участки им мешают, вероятно, специализированные клеточные контакты, называемые *плотными контактами.* Липидные молекулы внешнего (нецитоплазматического) монослоя плазматической мембраны также не могут диффундировать между двумя доменами, а липиды внутреннего (цитоплазматического) монослоя могут это делать.

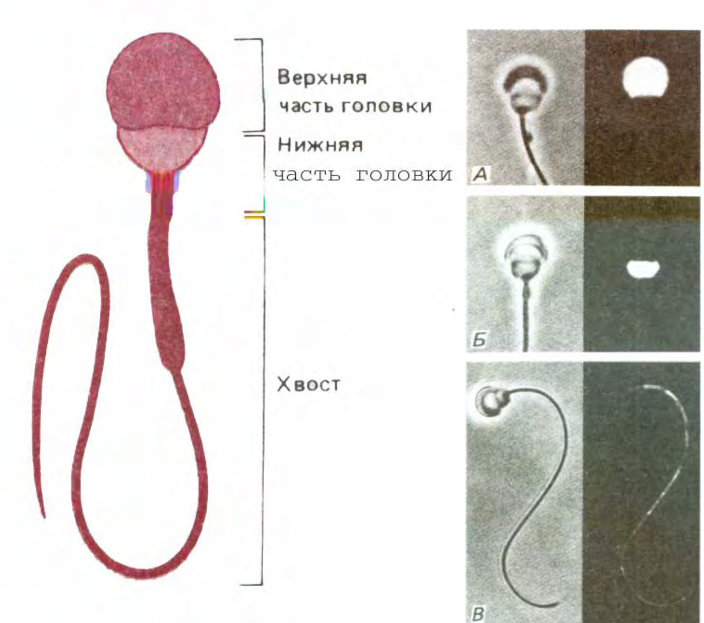


Рис. 6-37. Три домена плазматической мембраны сперматозоида морской свинки, выявляемые с помощью моноклональных антител. Сперматозоид показан схематически в верхней части рисунка. На каждой из трех микрофотографий *(А, Б* и *В)* иммунофлуоресцентное окрашивание клеточной поверхности различными моноклональными антителами сочетается с фазово-контрастным изображением тех же клеток. Антитела на *(А)* метят только верхнюю часть головки, на *(Б)* - только нижнюю часть головки, а на *(В)* - только хвост. *(А* и *Б* предоставлены D. G. Myles et al., Cell, 23, 434-439, 1981. В-предоставлена P. Primakoff и D. G. Myles, Dev. Biol., 98, 417-428, 1983.)

даря барьерам, образованным межклеточными контактами особого **рода - плотными контактами** (см. разд. 14.1.1). Вопрос о том, почему мембранные белки, формирующие межклеточные контакты, не перемещаются латерально во взаимодействующих мембранах (см. рис. 6-38, 5), обсуждается ниже.

Мембранные домены могут поддерживаться клеткой и без межклеточных контактов. К примеру, сперматозоид животных - это отдельная клетка, состоящая из двух структурно и функционально различных частей - головки и хвоста, покрытых непрерывной плазматической мембраной. При исследовании клеток спермы методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием различных антител к антигенам поверхности клетки обнаружили, что плазматическая мембрана состоит по крайней мере из трех различных доменов (рис. 6-37). В некоторых случаях антигены могут диффундировать внутри собственных обособленных доменов. Однако остается непонятным механизм того, каким образом поддерживается обособленность этих доменов.

В двух рассмотренных примерах диффузия белков и липидов ограничивалась специализированными доменами, расположенными на непрерывной плазматической мембране. У клеток есть и более сильные способы иммобилизации определенных мембранных белков. Это хорошо видно на примере пурпурных мембран *Halobacterium.* В данном случае молекулы бактериородопсина собраны в большие двумерные кристаллы, в которых отдельные белковые молекулы фиксированы по отношению друг к другу. Крупные агрегаты такого типа диффундируют очень медленно. В более общем случае ограничение латеральной подвижности специфических мембранных белков связано с их взаимодействием с макромолекулярными образованиями, находящимися снаружи или внутри клеток. Мы уже говорили о том, что некоторые мембранные белки эритроцитов тесно связаны с внутренним цитоскелетом. В клетках других типов белки плазматической мембраны могут быть также связаны с цитоскелетом или внеклеточным матриксом, либо и с тем и с другим. Четыре известных способа иммобилизации специфических мембранных белков показаны на рис. 6-38.

Заключение

Липидный бислой определяет основные структурные особенности биологических мембран, тогда как белки ответственны за большинство мембранных функций. Они выступают в качестве специфических рецепторов и ферментов, осуществляют транспорт через мембрану различных веществ и т. д. Большинство мембранных белков пронизывает бислой в виде одиночной α-спирали; но есть и такие, которые пересекают бислой несколько раз в виде серии α-спиралей. Следующая группа белков ассоциирует с мембраной, не пересекая бислой, а прикрепляясь к той или другой стороне мембраны. Многие из этих белков связаны нековалентными взаимодействиями с трансмембранными белками, есть и такие, которые

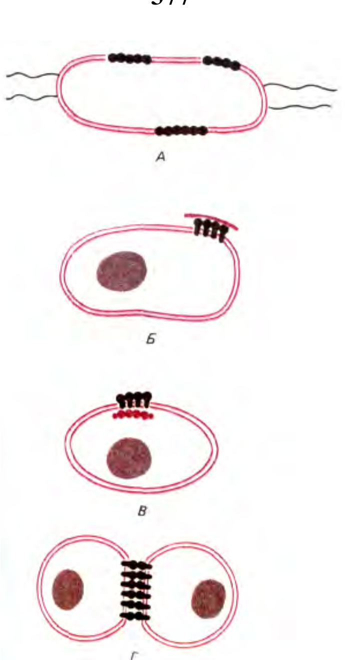


Рис. 6-38. Четыре способа ограничения латеральной подвижности белков плазматической мембраны. Белки могут ассоциировать в большие комплексы (как молекулы бактериородопсина в пурпурной мембране *Halobacterium) (А),* могут связываться с комплексами макромолекул снаружи *(Б)* или внутри клетки *(В)* или взаимодействовать с белками на поверхности другой клетки *(Г).*

имеют ковалентную связь с молекулами липидов. Большинство мембранных белков, так же как и липидов, способны свободно перемещаться в плоскости мембраны. С другой стороны, клетки могут и иммобилизовывать специфические мембранные белки, и удерживать их, как впрочем и липиды, в виде специальных доменов в непрерывном липидном бислое.

6.3. Мембранные углеводы

На поверхности всех эукариотических клеток имеются углеводы. Они представлены в виде олигосахаридных и полисахаридных цепей, ковалентно присоединенных к мембранным белкам (гликопротеины) и к липидам (гликолипиды). Масса углеводов плазматической мембраны колеблется от 2 до 10% от массы мембраны. Большинство белков плазматической мембраны, выступающих на поверхности клеток, связаны с остатками Сахаров. В то же время из десяти липидных молекул в наружном монослое большинства плазматических мембран с углеводами связана менее чем одна молекула (см. разд. 6.1.6). Пятидесятикратное превышение в мембране числа липидных молекул над молекулами белка означает, что липидных молекул, связанных с углеводами в обычной (типичной) мембране больше, чем белковых. Однако такой гликопротеин как гликофорин может иметь большое количество боковых олигосахаридных цепей, а каждая молекула гликолипида - лишь одну. Кроме того, многие плазматические мембраны содержат молекулы интегральных **протеогликанов.** Протеогликаны состоят из длинных полисахаридных цепей, присоединенных к белковому кору, и выявляются главным образом на внешней стороне клетки как часть внеклеточного матрикса. Однако в некоторых случаях кор интегральных протеогликанов, по-видимому, пронизывает липидный бислой.

6-18

6.3.1. Углеводы в биологических мембранах располагаются только на поверхности, не контактирующей с цитозолем [18]

Как мы уже знаем, биологические мембраны чрезвычайно асимметричны: наружный и внутренний монослои различаются как по липидному составу, так и по белковому. Такая же асимметрия наблюдается и в распределении углеводов; углеводные цепи основной массы гликолипидов, гликопротеинов и протеогликанов во внутренних и плазматических мембранах локализованы исключительно на той стороне мембраны, которая не контактирует с цитозолем. В плазматических мембранах остатки Сахаров выступают на внешнюю поверхность клетки, а во внутренних мембранах они обращены внутрь ограниченного мембраной компартмента. Существуют два различных варианта присоединения олигосахаридов к мембранным гликопротеинам: они могут быть «пришиты» N-связью к остаткам аспарагина в полипептидной цепи или О-связью к остаткам серина или треонина. N-связанные олигосахариды обычно содержат около 12 Сахаров и строятся на основе общего ядра, состоящего из остатков маннозы. О-связанные олигосахариды, как правило, короче (длиной около 4 сахарных остатков).

Одним из простейших способов демонстрации присутствия Сахаров на клеточной поверхности является использование белков, связывающих углеводы, и названных *лектинами.* Существует ряд белков, обладающих сайтами, узнающими и связывающими специфические последовательности сахарных остатков. Первоначально они были выделены из семян

Таблица 6-2. Наиболее популярные коммерческие препараты растительных лектинов и сахара, которые ими узнаются

Лектины	***Сахароспецифичность***
Конканавалин A	α-D-глюкоза и α-D-манноза
Лектин из сои	α-галактоза и N-ацетил-D-галактозамин
Лектин из зародышей пшеницы	N-ацетилглюкозамин
Лектин из семян лотоса	Фукоза

растений. Некоторые лектины чрезвычайно токсичны и служат для отпугивания животных, которые могли бы съесть семена. Совсем недавно было показано, что лектины имеются не только у растений, но и у многих других существ, включая животных. Некоторые из них находятся на поверхности клеток, и, по-видимому, участвуют в межклеточном узнавании (см. рис. 5-42). Поскольку лектины связываются с гликопротеинами, протеогликанами и гликолипидами, находящимися на поверхности клеток, они широко используются в клеточной биологии в качестве биохимического маркера для локализации и выделения молекул плазматической мембраны, содержащих сахара. В таблице 6-2 представлены наиболее часто используемые растительные лектины и указана их специфичность по отношению к сахарам.

Термин **клеточная оболочка,** или **гликокаликс,** часто используются для обозначения обогащенной углеводами периферической зоны на



Рис. 6-39. Электронная микрофотография поверхности лимфоцита, окрашенного рутениевым красным с целью получить контрастное изображение клеточной оболочки (гликокаликса). (С любезного разрешения A. M. Glauer и G. M. W. Cook.)

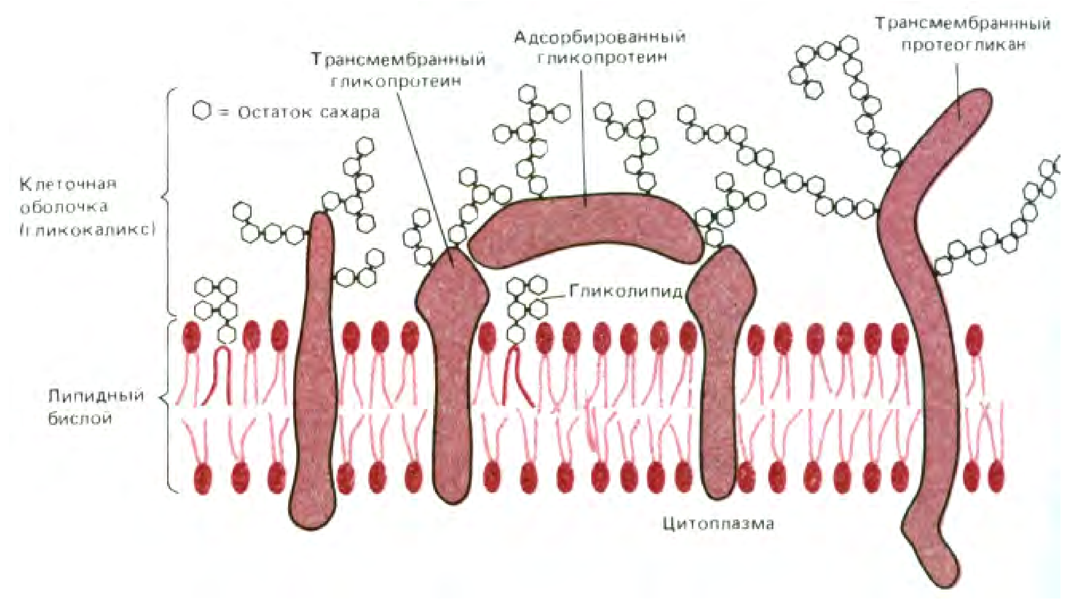


Рис. 6-40. Схематическое изображение клеточной оболочки (гликокаликса), состоящей из боковых олигосахаридных цепей гликолипидов и интегральных мембранных гликопротеинов и полисахаридных цепей протеогликанов. В некоторых клетках присутствуют также адсорбированные гликопротеины и протеогликаны (не показаны). Обратите внимание, что все углеводы располагаются на наружной стороне мембраны. Некоторые интегральные гликопротеины и протеогликаны могут быть ковалентно связаны через специфические олигосахариды с фосфатидилинозитолом, находящимся во внешнем монослое плазматической мембраны (см. рис. 6-14.)

поверхности большинства эукариотических клеток. При использовании меченых лектинов или различных красителей, например рутениевого красного, эта зона отчетливо видна на электронных микрофотографиях (рис. 6-39). Хотя углеводы главным образом присоединены к молекулам, входящим в состав плазматической мембраны, гликокаликс может также содержать гликопротеины и протеогликаны, которые секретируются клетками и затем адсорбируются на клеточной поверхности (рис. 6-40). Некоторые из этих адсорбированных макромолекул являются компонентами внеклеточного матрикса. Так что вопрос о том, где кончается плазматическая мембрана и начинается внеклеточный матрикс, можно считать чисто семантическим.

Ясно, что высокая концентрация углеводов на клеточной поверхности должна оказывать существенное влияние на многие функции плазматической мембраны. Однако природа этого влияния еще не понята. Структурная сложность некоторых олигосахаридов, а также то, что углеводы располагаются только на поверхности клетки, свидетельствуют о важной роли углеводов в процессах межклеточного узнавания и узнавания между клеткой и матриксом. Для некоторых случаев существуют веские доказательства этой роли (см. разд. 15.4.2 и 15.4.9), однако гораздо чаще такие функции углеводов клеточной поверхности однозначно доказать очень трудно.

Заключение

В плазматических мембранах всех эукариотических клеток большинство белков, расположенных на поверхности клетки, а также некоторые липидные молекулы наружного липидного монослоя ковалентно связаны с олигосахаридными цепями. Некоторые плазматические мембраны содержат молекулы интегральных протеогликанов, в которых несколько полисахаридных цепей ковалентно сшиты с трансмембранным белком или связанным с липидами коровым белком. Хотя функция углеводов клеточной поверхности пока непонятна, представляется вероятным, что по крайней мере некоторые из них принимают участие в процессах межклеточного узнавания и узнавания между клеткой и матриксом.

6.4. Перенос малых молекул через мембрану [19]

Поскольку внутренняя часть липидного бислоя гидрофобна, он представляет собой практически непроницаемый барьер для большинства полярных молекул. Благодаря такому барьеру предотвращается утечка водорастворимого содержимого клеток. Однако из-за наличия подобного барьера клетки оказались вынужденными создать специальные пути для переноса водорастворимых молекул через свои мембраны. Клетки должны получать необходимые питательные вещества и выделять вредные продукты метаболизма. Кроме того, клеткам надо регулировать внутриклеточные концентрации ионов, что подразумевает возможность транспорта определенных ионов в клетку или из клетки. Перенос малых водорастворимых молекул через липидный бислой осуществляется с помощью особых трансмембранных белков, каждый из которых отвечает за транспортировку определенной молекулы или группы родственных молекул. В клетках существуют также способы переноса через плазматические мембраны макромолекул, таких, как белки, и даже крупных частиц. Однако соответствующие механизмы сильно отличаются от механизмов транспорта малых молекул и потому будут обсуждаться в другом разделе (см. разд. 6.5).

Из данного раздела мы узнаем, что избирательная проницаемость

Таблица 6-3. Сравнение концентраций ионов внутри и снаружи типичной животной клетки

Компонент	Внутриклеточная концентрация (мМ)	Внеклеточная концентрация (мМ)
Катионы		
Na^+	5-15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0,5	1-2
Ca^{2+}	10^{-4}	1-2
H^+	8×10^{-5} ($10^{-7,1}$ М или pH 7,1)	4×10^{-5} ($10^{-7,4}$М или pH 7,4)
Анионы [1]		
Cl^-	5-15	110

[1] Поскольку клетки должны содержать равное число положительных и отрицательных зарядов (чтобы быть электрически нейтральными) значительный дефицит внутриклеточных анионов отражает тот факт, что большую часть клеточного содержимого составляют отрицательно заряженные молекулы (HCO_3^-, PO^{3-}, белки, нуклеиновые кислоты, метаболиты, несущие фосфатные или карбоксильные группы и т.п.). Концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} даны для свободных ионов. В клетках имеется около 20 мМ $Mд^{2+}$ и 1-2 мМ Ca^{2+} , но они в основном связаны белками и другими веществами, и в случае Ca^{2+} хранятся внутри различных органелл.

плазматической мембраны в сочетании с активным транспортом через нее создают значительные различия в ионном составе цитозоля и внеклеточной жидкости (табл. 6-3). Это позволяет клеточным мембранам запасать потенциальную энергию в виде градиентов концентраций ионов. Трансмембранные ионные градиенты используются для осуществления различных транспортных процессов, для передачи электрических сигналов и при синтезе АТР в митохондриях, хлоропластах и бактериях. Перед тем как приступить к обсуждению свойств транспортных белков и ионных градиентов, создаваемых некоторыми из этих белков, необходимо кое-что узнать о проницаемости синтетического липидного бислоя, не содержащего белков.

6.4.1. Липидные бислои, не содержащие белков, непроницаемы для ионов, но свободно пропускают воду [19]

В принципе любая молекула за достаточно длительное время пройдет за счет диффузии через лишенный белков липидный бислой по градиенту концентрации. Однако скорости, с которыми различные молекулы диффундируют через такой бислой, очень сильно варьируют в зависимости главным образом от размера молекулы и ее относительной растворимости в жирах. В общем случае, чем меньше молекула и чем более она «жирорастворима» (т. е. более гидрофобна, или неполярна), тем быстрее она будет диффундировать через бислой. *Малые неполярные молекулы,* такие, как O_2, легко растворяются в липидных бислоях и вследствие этого быстро диффундируют через них. *Незаряженные полярные молекулы* также диффундируют с большой скоростью, если они достаточно малы. Например, CO_2 (44 Да), этанол (46 Да) и мочевина (60 Да) проходят через бислой быстро, глицерол (92 Да) - медленнее, а глюкоза (180 Да) едва ли вообще способна пройти сквозь бислой (рис. 6-41). Весьма важно то, что вода (18 Да) диффундирует через липидный бислой очень быстро, несмотря на то что молекулы воды относительно нерастворимы в жирах. Это обусловлено тем, что ее молекулы малы и незаряжены.

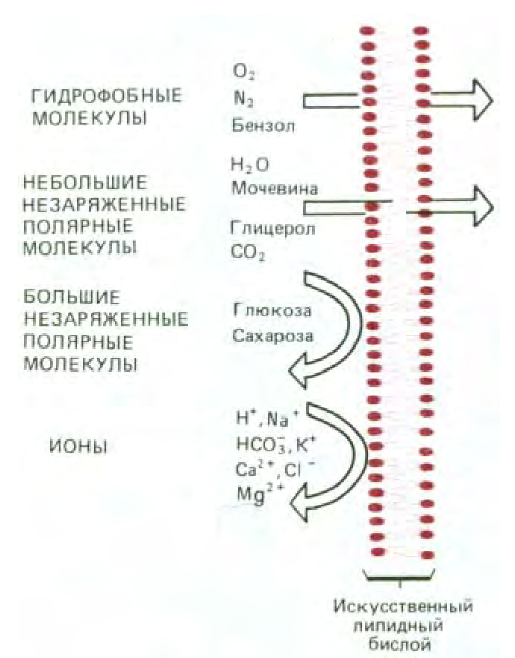


Рис. 6-41. Относительная проницаемость синтетического липидного бислоя для различных классов молекул. Чем меньше молекула и, что более важно, чем меньше она образует водородных связей, тем быстрее она диффундирует через мембрану.



Рис. 6-42. Коэффициенты проницаемости (см/с) синтетического липидного бислоя для различных молекул. Скорость потока растворенных молекул через бислой прямо пропорциональна разнице концентраций вещества на двух сторонах мембраны. Умножив разность концентраций (моль/см^3) на коэффициент проницаемости (см/с), получают поток растворенного вещества в молях за секунду через квадратный сантиметр мембраны. Например, разность концентраций триптофана 10^{-4} моль/см^3 (10^{-4}/ 10^{-3} л = 0,1 М) будет обеспечивать поток 10^{-4} моль/см^3 х 10^{-7} см/с = 10^{-11} моль/с через 1 см^2 мембраны, или 6 х 10^4 молекул/с через 1 мкм^2 мембраны.

Напротив, для всех *заряженных* молекул (ионов) независимо от их размеров липидные бислой оказываются в значительной степени непроницаемыми: заряд и высокая степень гидратации таких молекул препятствуют их проникновению через углеводородный участок бислоя. Вот почему искусственные бислой в 10^9 раз более проницаемы для воды, чем даже для таких небольших ионов, как Na^+ или K^+ (рис. 6-42).

6-19

6.4.2. Мембранные транспортные белки могут работать как переносчики или каналы [19]

Клеточные мембраны, так же как и искусственные липидные бислои, способны пропускать воду и неполярные молекулы за счет простой физической диффузии. Однако клеточные мембраны проницаемы и для различных полярных молекул, таких, как сахара, аминокислоты, нуклеотиды и многие другие метаболиты, которые проходят через синтетические бислои чрезвычайно медленно. За перенос подобных растворенных веществ через клеточные мембраны ответственны специфические белки, называемые **мембранными транспортными белками.** Они обнаруживаются во всех типах биологических мембран и могут сильно отличаться друг от друга. Каждый конкретный белок предназначен для определенного класса молекул (например, неорганических ионов, Сахаров или аминокислот), а нередко лишь какой-то разновидности молекул из этих классов. Специфичность транспортных белков была впервые показана, когда обнаружилось, что мутации в одном-единственном гене приводят к исчезновению у бактерий способности транспортировать определенные сахара через плазматическую мембрану. Аналогичные мутации теперь известны и у людей, страдающих различными наследственными болезнями, при которых нарушается транспорт тех или иных веществ в почках или кишечнике. Например, у индивидуумов с наследственной болезнью *цистинурией* отсутствует способность транспортировать определенные аминокислоты (включая цистин - связанный дисульфидной связью димер цистеина) из мочи или кишечника в кровь. В результате происходит накопление цистина в моче, что приводит к образованию цистиновых «камней» в почках.

Все мембранные транспортные белки, изученные настолько детально, что их расположение в мембране точно установлено, оказались трансмембранными белками, полипептидная цепь которых пересекает липидный бислой несколько раз. Эти белки обеспечивают перенос специфических веществ через мембрану без непосредственного контакта с гидрофобной внутренностью липидного бислоя, формируя в нем сквозные проходы.

Существуют два основных класса мембранных транспортных белков: **белки-переносчики и каналообразующие белки.** Белки-переносчики (называемые также *переносчиками* или *транспортерами)* связывают молекулу переносимого вещества, что приводит к их конформационным изменениям и как результат к переносу этой молекулы через мембрану. Напротив, каналообразующие белки (или белки-каналы) формируют заполненные водой поры, пронизывающие липидный бислой. Когда эти поры открыты, молекулы специфических веществ (обычно неорганические ионы подходящего размера и заряда) проходят сквозь них и, следовательно, через мембрану (рис. 6-43).

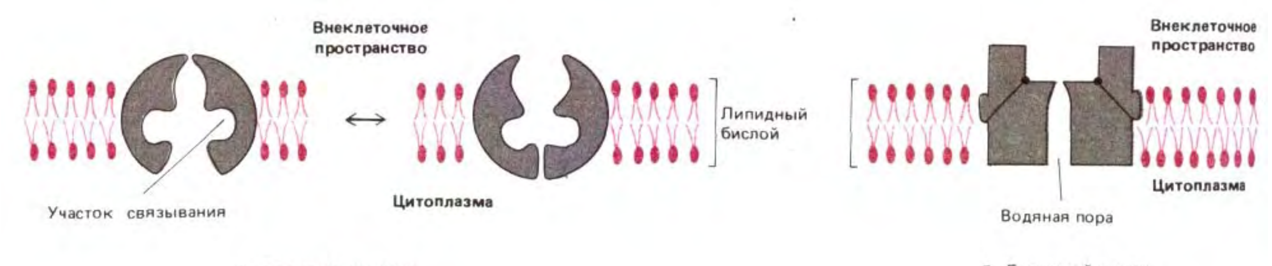


Рис. 6-43. Упрощенное схематическое изображение двух классов мембранных транспортных белков. *А. Белок-переносчик* может попеременно существовать в двух конформациях, так что участок связывания определенного вещества последовательно доступен то с одной, то с другой стороны бислоя. *Б. Каналообразующий белок* формирует в липидном бислое заполненные водой поры, через которые могут диффундировать специфические ионы.

6.4.3. Активный транспорт осуществляется белками-переносчиками, связанными с источником энергии [21]

Все каналообразующие белки и многие белки-переносчики позволяют растворенным веществам проходить через мембраны только пассивно («с горки»). Этот процесс называется **пассивным транспортом** (или **облегченной диффузией).** Если молекула транспортируемого вещества не имеет заряда, то направление пассивного транспорта определяется только разностью концентраций этого вещества по обеим сторонам мембраны *(градиентом концентрации)*. Однако если молекула заряжена, то на ее транспорт влияют как градиент концентрации, так и разница электрических потенциалов на сторонах мембраны *(мембранный потенциал)*. Вместе концентрационный и электрический градиенты составляют **электрохимический градиент.** Фактически в любой плазматической мембране есть градиент электрического поля. При этом внутренняя сторона мембраны обычно заряжена отрицательно по отношению к наружной (см. разд. 6.4.15). Такой потенциал облегчает проникновение в клетку положительно заряженных ионов, но препятствует прохождению внутрь ионов, заряженных отрицательно.

Клеткам также необходимы транспортные белки, активно перекачивающие определенные растворенные вещества против их электрохимических градиентов («в горку»). Этот процесс, известный под названием **активного транспорта,** всегда осуществляется белками-переносчиками. Как будет рассмотрено ниже, при активном транспорте перекачивающая активность переносчиков является направленной, поскольку она тесно связана с источником метаболической энергии, таким, как гидролиз АТР или градиент ионов. Таким образом, транспорт, осуществляемый белками-переносчиками, может быть как активным, так и пассивным, в то время как транспорт через каналы является всегда пассивным (рис. 6-44).

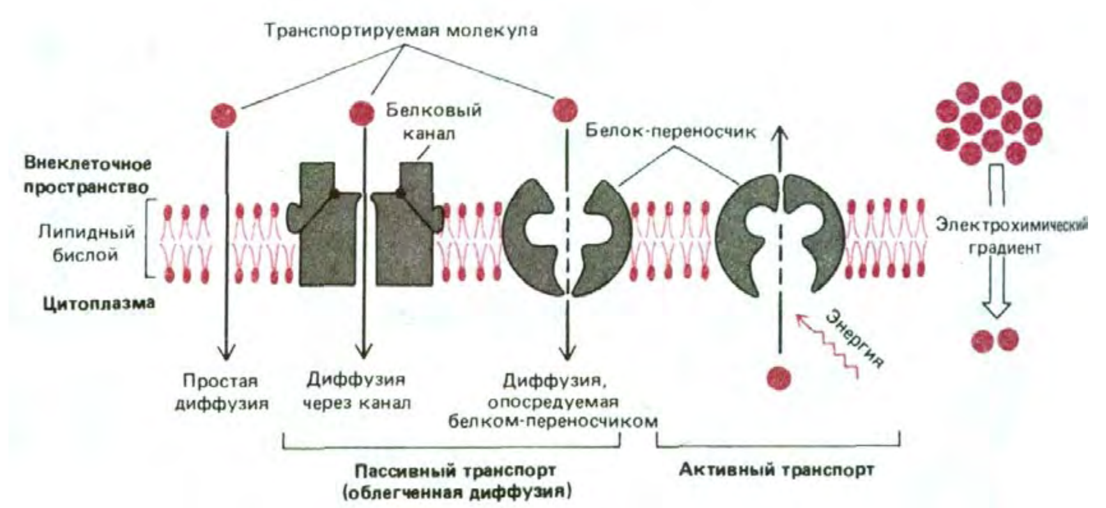


Рис. 6-44. Схематическое изображение *пассивного транспорта* молекул по электрохимическому градиенту и активного транспорта против. Простая диффузия и пассивный транспорт, осуществляемый транспортными белками (облегченная диффузия) протекают самопроизвольно. Для активного транспорта необходимо использовать метаболическую энергию. Только неполярные и маленькие незаряженные полярные молекулы могут проходить через липидный бислой путем простой диффузии. Перенос других полярных молекул осуществляется со значительными скоростями белками-переносчиками или каналообразующими белками.



Рис. 6-45. Кинетика простой диффузии и кинетика диффузии при участии белка-переносчика. В первом случае скорость всегда пропорциональна концентрации транспортируемого вещества, а во втором скорость достигает максимального значения V_{max} при насыщении белков-переносчиков. Концентрация, при которой скорость составляет половину максимального значения, принимается равной константе связывания $K_м$ молекул транспортируемого вещества данным переносчиком (аналогично $K_м$ для системы фермент-субстрат).

6-20

6.4.4. Белки-переносчики действуют как связанные с мембраной ферменты [19]

Процесс, с помощью которого белки-переносчики специфически связывают и транспортируют растворенные молекулы через липидный бислой, напоминает ферментативную реакцию, а транспортные белки выступают как особые, связанные с мембраной, ферменты. В белках-переносчиках всех типов имеются участки связывания для транспортируемой молекулы (субстрата). Когда белок насыщен (т. е. когда все участки связывания заняты), скорость транспорта максимальна. Эта скорость, обозначаемая V_{max}, является характеристикой данного белка-переносчика. Кроме того, каждый белок-переносчик имеет характерную для него константу связывания $K_м$, равную концентрации транспортируемого вещества, при которой скорость транспорта составляет половину ее максимальной величины (рис. 6-45). Связывание растворенного вещества может быть специфически блокировано как конкурентными ингибиторами (конкурирующими за тот же участок связывания), так и неконкурентными ингибиторами (связывающимися где-нибудь в другом месте и специфически влияющими на структуру переносчика). Однако в данном случае аналогия с реакцией фермент-субстрат неполная, поскольку транспортируемые вещества обычно не модифицируются ковалентно белками-переносчиками.

Некоторые транспортные белки просто переносят какое-либо растворенное вещество с одной стороны мембраны на другую. Такой простой перенос называется **унипортом.** Другие белки функционируют как **котранспортные системы,** в которых перенос одного растворенного вещества зависит от одновременного или последовательного переноса другого вещества либо в том же направлении **(симпорт),** либо в противоположном **(антипорт)** (рис. 6-46). Например, большинство животных клеток поглощают глюкозу из внеклеточной жидкости, где ее концентрация относительно высока, путем *пассивного* транспорта, осуществляемого специфическими переносчиками глюкозы, работающими как унипорты. Напротив, клетки кишечника и почек поглощают глюкозу из люменального пространства кишечника и почечных канальцев, где концентрация этого сахара мала. В данном случае имеет место симпорт глюкозы и ионов Na^+ , внеклеточная концентрация которых очень высока. Как уже обсуждалось раньше, переносчик анионов (белок полосы 3) в эритроцитах человека работает по механизму антипорта при обмене Cl^- на HCO_3^-.

Молекулярный механизм работы белков-переносчиков пока неизвестен. Предполагается, что они переносят растворенные вещества через бислой, претерпевая обратимые конформационные изменения, которые

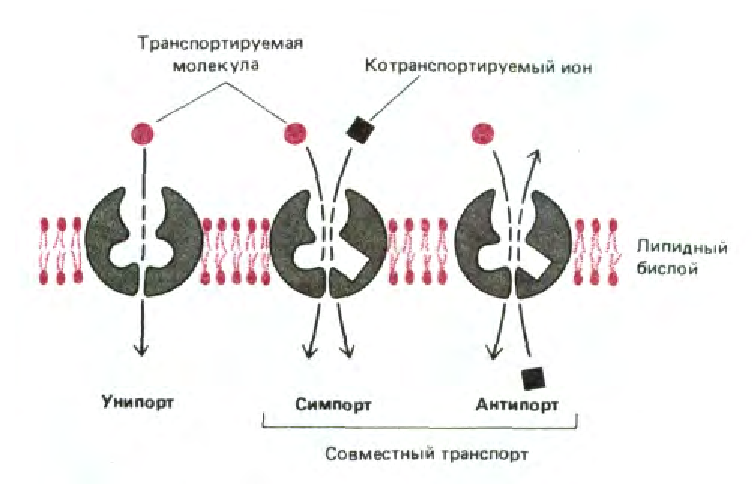


Рис. 6-46. Схема работы белков-переносчиков, функционирующих по принципу унипорта, симпорта и антипорта.

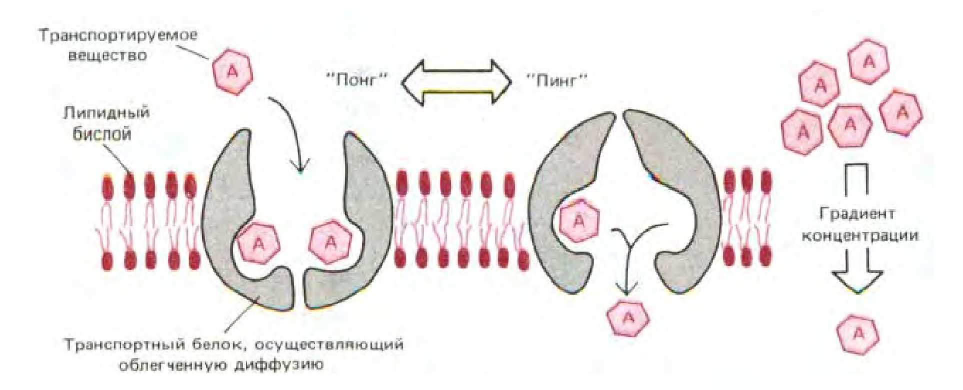


Рис. 6-47. Гипотетическая модель, показывающая как конформационные изменения в белке-переносчике могли бы обеспечить облегченную диффузию растворенного вещества *А*. Белок-переносчик может существовать в двух конформационных состояниях: в состоянии «понг» участки связывания для А открыты с наружной стороны бислоя; в состоянии «пинг» те же участки оказываются открытыми с другой стороны. Переход между двумя состояниями осуществляется случайным образом и полностью обратим. Поэтому при более высокой концентрации А с наружной стороны бислоя с белком-переносчиком будет связываться большее число молекул А в состоянии «понг», что приведет к транспорту вещества А по градиенту его концентрации.

позволяют им попеременно экспонировать участки связывания растворенных веществ то с одной, то с другой стороны. Схематическая модель того, как мог бы осуществляться этот процесс показана на рис. 6-47. Теперь мы знаем, что переносчики представляют собой трансмембранные белки, цепь которых пересекает бислой несколько раз. Маловероятно, что такие белки беспрестанно перескакивают в мембране из одного монослоя в другой или перемещаются взад-вперед через липидный бислой, как это предполагали раньше.

Далее мы убедимся в том, что сравнительно небольшая модификация модели, изображенной на рис. 6-47, позволяет связать белок-переносчик с источником энергии, например гидролизом АТР (см. рис. 6-49). Замечательным примером белка-переносчика, использующего энергию гидролиза АТР для перекачки ионов, служит *(Na^+ + K^+)-насос,* играющий решающую роль в образовании мембранного потенциала на плазматических мембранах животных клеток.

6-23

6.4.5. (Na^+ + K^+)-насос плазматической мембраны - это АТРаза [22]

Концентрация K^+ внутри клетки, как правило, в 10-20 раз выше, чем снаружи. Для ионов Na^+ - картина прямо противоположная (см. табл. 6-3). Такая разница в концентрациях ионов обеспечивается работой (Na^+ + K^+)-насоса, обнаруженного в плазматических мембранах практически всех животных клеток. Этот насос работает по принципу антипорта, активно перекачивая Na^+ из клеток, а K^+ внутрь клеток против их крутых электрохимических градиентов. Ниже будет показано, что градиент Na^+, создаваемый насосом, регулирует объем клеток за счет осмотических эффектов. Он также используется для осуществления транспорта Сахаров и аминокислот в клетку. Почти треть всей энергии, необходимой для жизнедеятельности животной клетки, тратится именно на работу этого насоса. В электрически активных нервных клетках при распространении потенциала действия происходит многократное накапливание небольших порций Na^+ и потери небольших количеств K^+ (см. ниже). При этом на восстановление уходит около 2/3 энергии, необходимой клетке.

Значительный шаг вперед в понимании молекулярного механизма работы натриево-калиевого насоса был сделан в 1957 г., когда обнаружилось, что для оптимальной активности фермента, гидролизующего АТР до ADP и фосфата, требуется Na^+ и K^+ . Кроме того, было показано, что известный ингибитор (Na^+ + K^+)-насоса *уабаин* ингибирует также и АТРазу. Таким образом, была установлена связь между (Na^+ + K^+)-АТРазой и натриево-калиевым насосом. Однако главное доказательство того, что именно гидролиз АТР обеспечивает насос

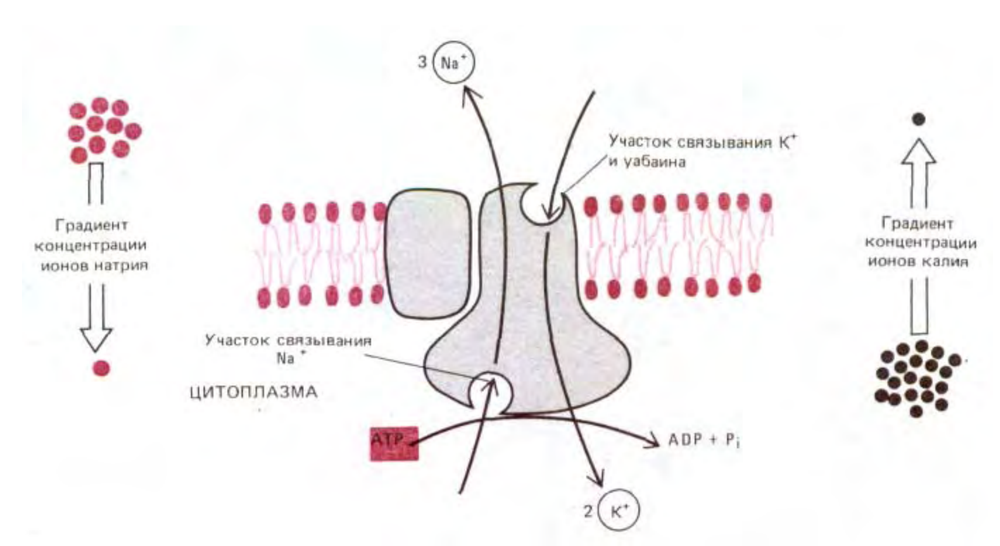


Рис. 6-48. (Na^+ + K^+)-АТРаза активно качает Na^+ наружу, а K^+ внутрь клетки против их электрохимических градиентов. При гидролизе внутри клетки каждой молекулы АТР три иона Na^+ выкачиваются из клетки и два иона K^+ накачиваются в клетку. Специфический ингибитор насоса уабаин и ионы K^+ конкурируют за общий участок на внеклеточной стороне АТРазы.

необходимой для работы энергией, было получено при изучении замкнутых теней эритроцитов. В этих опытах можно было варьировать концентрации ионов с каждой стороны мембраны и наблюдать, как эти изменения влияют на транспорт ионов и гидролиз АТР. Было обнаружено, что 1) транспорт ионов натрия и калия и гидролиз АТР тесно связаны между собой, так что ни один из этих процессов не может осуществляться без другого; 2) транспорт ионов и гидролиз АТР происходят лишь в том случае, когда N^+ и АТР присутствуют внутри теней, а K^+ - снаружи; 3) уабаин ингибирует АТРазу только находясь с внешней стороны теней, где он конкурирует за K^+ -связывающий участок; 4) при гидролизе каждой молекулы АТР (одна молекула АТРазы может гидролизовать 100 молекул АТР за 1 с) три иона натрия выкачиваются наружу и два иона калия накачиваются внутрь (рис. 6-48).

Эти эксперименты неопровержимо доказали, что АТР поставляет энергию для перекачивания ионов натрия и калия через плазматическую мембрану; тем не менее оставалось непонятным, как именно гидролиз АТР связан с транспортом ионов. Дальнейшие исследования показали, что концевая фосфатная группа АТР в присутствии Na^+ переносится на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле АТРазы. Связанная с АТРазой фосфатная группа затем гидролизуется в присутствии K^+, и именно этот последний этап ингибируется уабаином. Na^+-зависимое фосфорилирование сопряжено с изменением конформации АТРазы, что приводит к выведению натрия из клетки. Наоборот, K^+-зависимое дефосфорилирование, осуществляемое вслед за этим, обусловливает транспорт ионов калия внутрь клетки и возвращение АТРазы в первоначальное состояние (рис. 6-49).

(Na^+ + K^+)-насос в тенях эритроцитов можно заставить работать в *противоположном* направлении - для *синтеза АТР. Если градиенты* концентраций ионов натрия и калия в эксперименте увеличить до такой степени, что энергия их электрохимических градиентов будет выше химической энергии гидролиза АТР, то ионы будут проходить через мембрану по их электрохимическим градиентам, а АТР будет синтезироваться из ортофосфата и ADP с помощью натриево-калиевой АТРазы. Таким образом, фосфорилированная форма АТРазы (позиция 2 на рис. 6-49) может релаксироваться либо перенося фосфат на ADP (от позиции 2 к позиции 1), либо изменяя свою конформацию (от позиции 2 к позиции 3). Будет ли общее изменение свободной энергии использоваться для синтеза АТР или же для выкачивания Na^+ из теней эритроцитов, зависит от относительных концентраций АТР, ADP и фосфата и от электрохимических градиентов ионов натрия и калия.

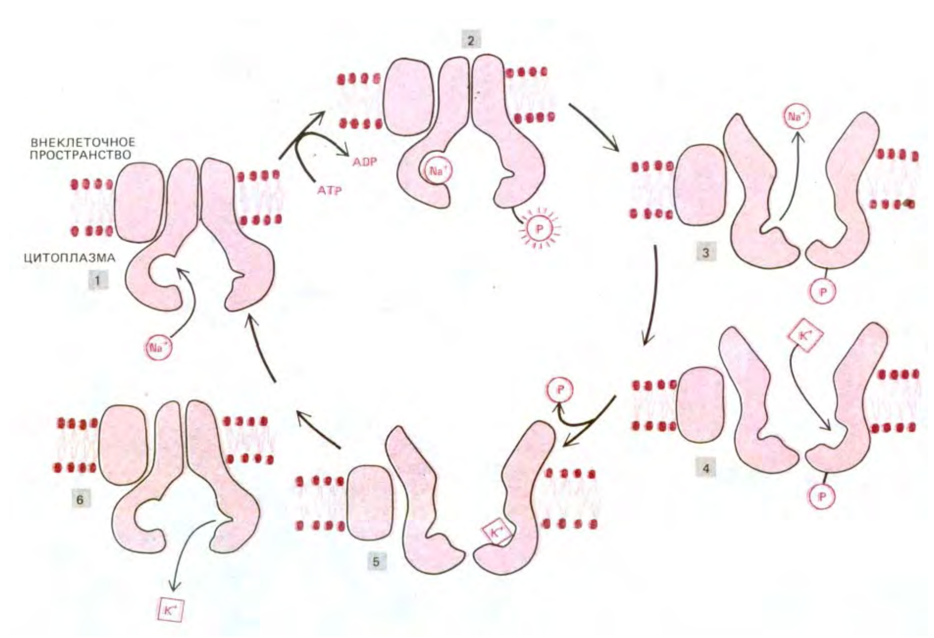


Рис. 6-49. Модель функционирования ($Na^+ + K^+$)-АТРазы. Связывание Na^+ (1) и последующее фосфорилирование (2) АТРазы со стороны цитоплазмы индуцируют в белке конформационные изменения, в результате которых Na^+ переносится через мембрану и высвобождается в межклеточное пространство (3). Затем связывание K^+ на внешней поверхности (4) и последующее дефосфорилирование (5) возвращают белок в первоначальную конформацию; при этом K^+ проходит через мембрану и высвобождается в цитоплазму (6). Эти конформационные изменения аналогичны переходам типа «пинг-понг», изображенным на рис. 6-47, за исключением того, что здесь конформационные переходы индуцируются Na^+-зависимым фосфорилированием и K^+-зависимым дефосфорилированием белка, вследствие чего он совершает полезную работу. Для простоты показано только по одному участку связывания Na^+ и K^+. В реальном насосе, видимо, существует три участка связывания Na^+ и два - K^+.

После того как ($Na^+ + K^+$)-АТРаза была получена в чистом виде, выяснилось, что она состоит из двух субъединиц - большой (длиной около 1000 аминокислотных остатков) трансмембранной, пересекающей бислой несколько раз и обладающей каталитической активностью, и ассоциированного с ней более мелкого гликопротеина. Первая субъединица имеет участки связывания для Na^+ и АТР на цитоплазматической стороне, а для K^+ и уабаина на наружной. Кроме того, она обратимо фосфорилируется и дефосфорилируется. Функция гликопротеина неизвестна. Работающий натриево-калиевый насос можно реконструировать из очищенного комплекса: АТРазу солюбилизируют в детергенте, очищают и смешивают с соответствующими фосфолипидами. После удаления детергента образуются мембранные пузырьки, которые в присутствии АТР качают Na^+ и K^+ в противоположных направлениях (см. рис. 6-21).

6.4.6. ($Na^+ + K^+$)-АТРаза необходима для поддержания осмотического равновесия и стабилизации объема клеток [23]

Поскольку ($Na^+ + K^+$)-АТРаза выкачивает три положительно заряженных иона на каждые два, накачанные внутрь клетки, она оказывается «электрогенной». Это значит, что через мембрану течет ток, создающий электрический потенциал с отрицательным значением во внутренней части клетки по отношению к ее наружной поверхности. Однако этот эффект насоса дает не более 10% вклада в мембранный потенциал. Остальные 90% потенциала создаются, как мы увидим, работой насоса косвенным образом и связаны с различной концентрацией K^+ по разные стороны мембраны. Повышенные концентрации калия внутри клетки

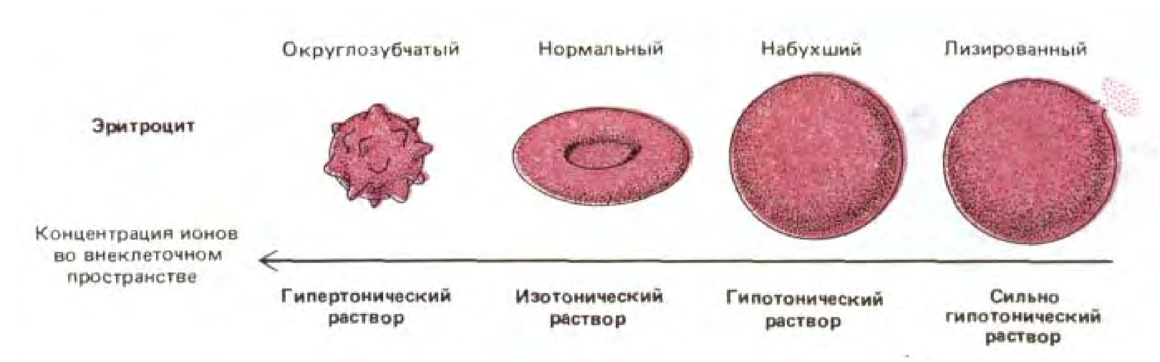


Рис. 6-50. Реакция эритроцитов человека на изменение осмотических условий во внеклеточной жидкости. Вода всасывается в клетку или выходит из нее по градиенту концентрации, поскольку плазматическая мембрана хорошо проницаема для молекул воды. Этот процесс называется *осмосом.* При помещении клеток в *гипотонический раствор* (т.е. в раствор с низкой концентрацией соли и, следовательно, с высокой концентрацией воды) молекулы воды движутся внутрь клеток, что приводит к их разбуханию и разрыву (лизису). Наоборот, при помещении клеток в *гипертонический раствор* они будут сморщиваться (см. также схему 2-1).

необходимы для сбалансирования большого суммарного отрицательного заряда, обусловленного клеточными *фиксированными анионами* - множеством отрицательно заряженных органических молекул, находящихся внутри клетки и не способных проникать через плазматическую мембрану.

(Na^+ + K^+)-АТРаза играет непосредственную роль в регуляции клеточного объема. Она контролирует концентрацию растворов внутри клетки, а следовательно, и осмотические силы, приводящие к разбуханию или сжатию клетки (рис. 6-50). Как объясняется на схеме 6-1, растворы внутри клетки (включая фиксированные анионы и сопутствующие катионы, необходимые для уравновешивания их заряда) поддерживают большой осмотический градиент, насасывающий воду внутрь клетки. В животных клетках этот эффект нейтрализуется высокими концентрациями неорганических ионов (главным образом Na^+ и Cl^-), находящихся во внеклеточной жидкости. Натриево-калиевая АТРаза поддерживает осмотическое равновесие, выкачивая втекающие по ступенчатому градиенту ионы Na^+ из клетки; Cl^- удерживаются вне клетки благодаря мембранному потенциалу.

Важная роль (Na^+ + K^+)-АТРазы в регуляции клеточного объема подтверждается тем фактом, что при обработке животных клеток уабаином, ингибирующим натриево-калиевую АТРазу, они разбухают и разрываются. Осмотические проблемы могут решаться в клетках и другими способами. У многих бактерий и растительных клеток плазматическая мембрана окружена полужесткой стенкой, предохраняющей клетку от разрыва. У амеб излишек воды, проникающий внутрь в результате осмоса, собирается в сократительных вакуолях, периодически выбрасывающих свое содержимое наружу (схема 6-1). Однако в большинстве животных клеток основная роль в предотвращении разрыва из-за осмотического давления принадлежит (Na^++K^+)-АТРазе.

6.4.7. Некоторые Ca^{2+}-насосы - это тоже мембраносвязанные АТРазы [24]

Концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле эукариотических клеток поддерживается на гораздо более низком уровне (~ 10^{-7} М) по сравнению с его концентрацией снаружи клетки (~ 10^{-3} М). Даже небольшой приток Ca^{2+} извне значительно увеличивает концентрацию свободного Ca^{2+} в цитозоле, а поток ионов кальция, устремляющийся по ступенчатому градиенту в ответ на внешние сигналы - один из способов передачи таких сигналов через плазматическую мембрану (см. разд. 12.3.7). Градиент Ca^{2+} частично поддерживается с помощью существующих в плазматической мембране Ca^{2+}-насосов, активно выводящих кальций из клетки. Известно, что один из таких насосов является АТРазой, а другой работает как антипорт, обусловленный электрохимическим градиентом Na^+ (см. ниже).

ИСТОЧНИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ОСМОТИЧНОСТИ



Макромолекулы слабо влияют на осмотическое давление внутри клетки, поскольку каждая из них, хотя и имеет большие размеры, есть всего лишь одна молекула, и число таких молекул просто мало по сравнению с числом малых молекул. Однако большинство биологических молекул сильно заряжены, и потому они удерживают около себя множество неорганических ионов противоположного заряда. Это большое число противоионов и вносит основной вклад во внутриклеточную осмотичность.



В результате активного транспорта и метаболических процессов клетки содержат высокие концентрации малых органических молекул, таких, как сахара, аминокислоты и нуклеотиды, для которых плазматическая мембрана является практически непроницаемой. Поскольку большинство этих метаболитов заряжены, они также окружены противоионами. Таким образом, как сами малые метаболиты, так и их противоионы существенно влияют на осмотическое давление внутри клеток.



Осмотичность внеклеточной жидкости определяется главным образом малыми неорганическими ионами Они медленно перемещаются внутрь клетки через плазматическую мембрану. Если бы они не выкачивались обратно и если бы внутри клетки не было бы других молекул, взаимодействующих с ними, то со временем система пришла бы в равновесие с одинаковыми концентрациями ионов внутри и снаружи клетки. Однако существование заряженных макромолекул и метаболитов в клетке, окруженных облаком противоионов, приводит к усилению эффекта Доннана. Этот эффект приводит к тому, что даже при равновесии общая концентрация неорганических ионов (и соответственно их вклад в осмотичность) внутри клетки должна быть выше, чем снаружи.

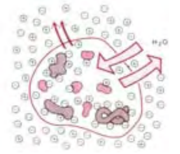
ПРОБЛЕМА

Если бы не существовала система осморегуляции, общая концентрация растворенных веществ внутри клетки оказалась бы больше, чем снаружи. Это означает, что концентрация воды снаружи была бы больше, чем внутри. Такая разница в концентрации воды по обеим сторонам плазматической мембраны приводила бы к постоянному притоку воды внутри клетки в результате осмоса, вызывая разрыв клетки.



РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Животные клетки и бактерии контролируют осмотическое давление внутри клетки с помощью активного выкачивания неорганических ионов, таких, как Na^+, так что их общая концентрация внутри клетки ниже, чем во внеклеточной жидкости.



Клетки растений ограничивают набухание благодаря их жестким стенкам и, таким образом, могут выдерживать осмотическое давление на их плазматическую мембрану: в зависимости от количества поступающей внутрь воды увеличивается и внутриклеточное давление со стороны стенки, уравновешивающее разрывающие клетку силы.



Многие простейшие избегают набухания, несмотря на осмотическое давление, благодаря способности периодически выбрасывать поступающую воду в специальных сократительных вакуолях.



Схема 6-1. Внутриклеточный водный баланс: проблема и ее решение.

Наиболее изученным из Ca^{2+}-насосов является мембраносвязанная АТРаза из *саркоплазматического ретикулума* мышечных клеток. Саркоплазматический ретикулум образует сеть тонких каналов в цитоплазме мышечных клеток и служит внутриклеточным хранилищем ионов кальция. Когда потенциал действия деполяризует мембрану мышечной клетки, Ca^{2+} высвобождается из саркоплазматического ретикулума в цитозоль, стимулируя мышцу к сокращению (см. разд. 11.1.4). Кальциевый насос отвечает за перекачивание Ca^{2+} из цитозоля в саркоплазматический ретикулум. Подобно натриево-калиевому насосу, Ca^{2+}-насос - это АТРаза, которая фосфорилируется и дефосфорилируется в каждом цикле работы и накачивает два иона кальция внутрь саркоплазматического ретикулума в расчете на каждую гидролизованную молекулу АТР. Поскольку Ca^{2+} -АТРаза - это преобладающий белок в мембране саркоплазматического ретикулума (она составляет около 90% всего белка данной структуры), ее довольно легко очистить. Оказалось, что молекула этого белка состоит из одной длинной полипептидной цепи (около 1000 аминокислотных остатков), пронизывающей мембрану несколько раз; после включения в фосфолипидные пузырьки кальциевая АТРаза осуществляет сопряженный с гидролизом АТР перенос ионов Ca^{2+} . Эксперименты по клонированию и секвенированию ДНК свидетельствуют о гомологии Ca^{2+} -АТРазы большой каталитической субъединице (Na^{+} + K^{+})-АТРазы, что говорит об эволюционном родстве этих двух ионных насосов.

В немышечных клетках органеллы эквивалентные саркоплазматическому ретикулуму также содержат Ca^{2+} -АТРазу, выкачивающую Ca^{2+} из цитозоля. В ответ на специфические внеклеточные сигналы этот, изолированный от клетки, Ca^{2+} возвращается опять в цитозоль.

6.4.8. Мембранносвязанные ферменты, синтезирующие АТР, это транспортные АТРазы, действующие в обратном направлении [25]

В плазматических мембранах бактерий, во внутренних мембранах митохондрий и тилакоидных мембранах хлоропластов обнаруживаются ферменты, очень похожие на две обсуждавшиеся выше транспортные АТРазы. Однако здесь они обычно действуют в обратном направлении. Вместо гидролиза АТР, обеспечивающего транспорт ионов, они катализируют синтез АТР из ADP и фосфата, осуществляемый благодаря наличию на этих мембранах градиента протонов. Градиент H^{+} возникает на отдельных этапах транспорта электронов в процессе окислительного фосфорилирования (у аэробных бактерий и в митохондриях) или фотосинтеза (в хлоропластах), а также с помощью фотоактивируемого протонного насоса (бактериородопсина у Halobacterium). Эти ферменты, в норме синтезирующие АТР, названы *АТР-синтетазами.* Как и транспортные АТРазы, они способны работать в обоих направлениях в зависимости от условий: либо гидролизовать АТР и качать H^{+} через мембрану во внутреннее пространство, либо синтезировать АТР при прохождении потока ионов H^{+} через молекулы ферментов в обратном направлении. АТР-синтетазы ответственны за продукцию практически всего АТР в большинстве клеток и более детально обсуждаются в гл. 9.

6.4.9. Активный транспорт может осуществляться с помощью ионных градиентов [26]

Многие системы активного транспорта приводятся в действие за счет энергии, запасенной в ионных градиентах, а не путем прямого гидролиза АТР. Все ионы работают как парные транспортеры: одни функциони-

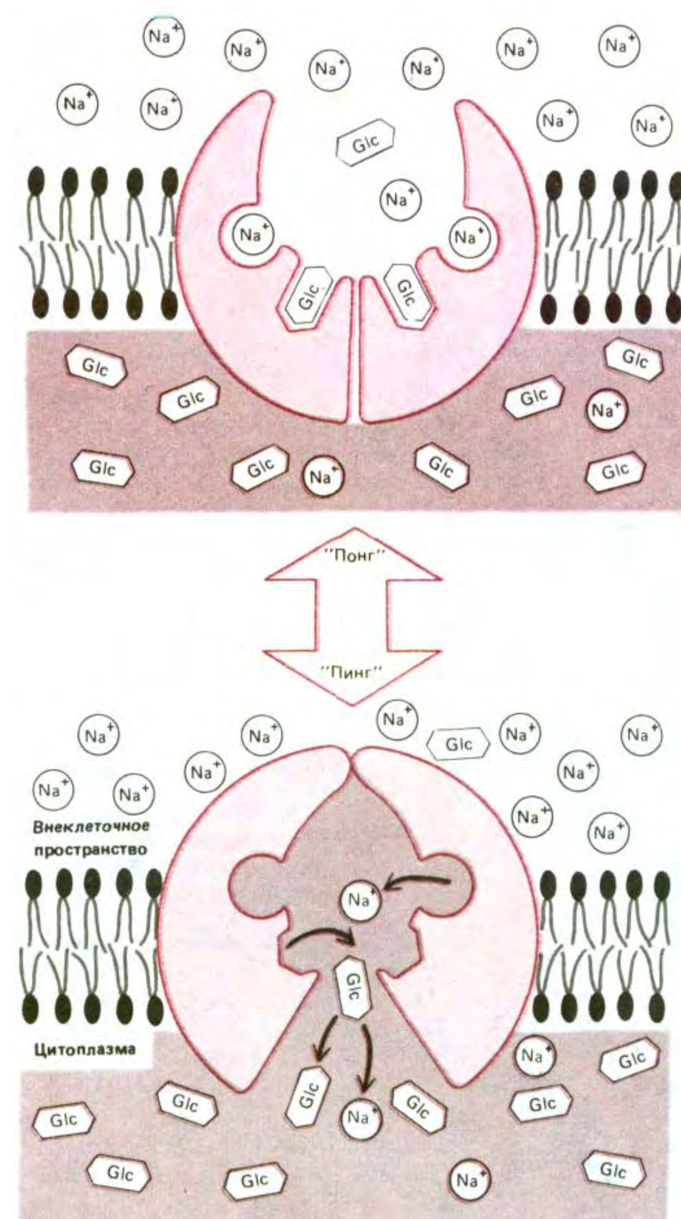


Рис. 6-51. Принципы использования градиента Na^+ для работы насоса, перекачивающего глюкозу. Насос осциллирует случайным образом между двумя состояниями: «пинг» и «понг», как на рис. 6-47. Na^+ связывается одинаково хорошо с белком в любой конформации. Связывание Na^+ индуцирует аллостерический переход белка в состояние с сильно увеличенным сродством к глюкозе. Поскольку концентрация Na^+ вне клетки выше, чем в цитозоле, связывание глюкозы с насосом более вероятно в конформации «понг». Поэтому перенос Na^+ и глюкозы в клетку (переход «понг» → «пинг») происходит намного чаще, чем наоборот, т.е. осуществляется направленный перенос. Поддерживая градиент Na^+ на определенном уровне (Na^+ + K^+)-АТРаза косвенным образом обеспечивает такую транспортную систему энергией. Говорят, что переносчики, работающие по такому принципу, осуществляют *вторичный активный транспорт,* тогда как АТРаза осуществляет первичный активный транспорт.

руют по принципу симпорта, а другие - антипорта. В животных клетках котранспортируемым ионом обычно оказывается Na^+ . Его электрохимический градиент обеспечивает энергией активный транспорт второго вида молекул. Проникающий при этом внутрь клетки Na^+ выкачивается (Na^+ + K^+)-АТРазой, которая, обеспечивая градиент Na^+ , косвенным образом осуществляет транспорт. Например, клетки кишечника и эпителиальные клетки почек содержат разнообразные симпортные системы, работающие благодаря трансмембранному градиенту Na^+ . Каждая система специфична для переноса внутрь клетки небольшой группы родственных Сахаров или аминокислот. В этих системах растворенные молекулы и ионы натрия связываются с различными участками на белке-переносчике; Na^+ стремится войти в клетку по своему электрохимическому градиенту и как бы «тащит» молекулы сахара или аминокис-

лоты внутрь клетки за собой. Чем выше градиент Na^+ , тем больше скорость всасывания растворенных молекул. Наоборот, если концентрация Na^+ во внеклеточной жидкости заметно уменьшается, - транспорт растворенных молекул останавливается. Гипотетическая (и довольно упрощенная) схема функционирования подобной системы симпорта изображена на рис. 6-51.

У бактерий и растений большинство систем активного транспорта, приводящихся в действие ионными градиентами, используют в качестве котранспортируемого иона H^+, а не Na^+ . В частности, активный транспорт большей части Сахаров и аминокислот в бактериальные клетки обусловлен градиентом H^+ через плазматическую мембрану. Наиболее хорошо изученный пример такого рода - *переносчик лактозы* (пермеаза). Этот трансмембранный белок, состоящий из одной полипептидной цепи (длиной около 400 аминокислотных остатков), по-видимому, пересекает липидный бислой по крайней мере девять раз. Он осуществляет H^+-зависимый симпорт: с каждой транспортируемой в клетку молекулой лактозы переносится один протон.

6.4.10. Антипорты в плазматической мембране регулируют внутриклеточное значение pH [27]

Почти все клетки позвоночных имеют в составе плазматической мембраны (Na^+ + H^+ **)-переносчик-обменник.** Он играет ключевую роль в поддержании внутриклеточного значения pH (pH_i) обычно около 7,1 — 7,2. Этот переносчик обеспечивает сопряжение выброса ионов H^+ с притоком ионов Na^+ и, таким образом, удаляет избыток ионов H^+ , образующийся в результате клеточных реакций окисления. Работа (Na^+ + H^+)-обменника регулируется значением pH: например, когда pH_i в мышечных клетках цыпленка выше уровня 7,7 - обменник становится неактивным; как только значение Ph_i падает - активность обменника увеличивается, достигая половины своей максимальной активности при pH_i 7,4. Такая регуляция обусловлена связыванием H^+ с регуляторным участком обменника, находящимся на цитоплазматической стороне мембраны. Важность (Na^++ K^+)-обменника в поддержании уровня pH_i была продемонстрирована экспериментами с мутантами фибробластов, не содержащими такого обменника: они очень быстро погибали при помещении их в достаточно кислые условия, хотя нормальные фибробласты в этих условиях жизнеспособны. В поддержании уровня pH_i у многих ядерных клеток, по-видимому, играет важную роль и ($C1^-$ + HCO_3)-обменник, сходный с белком полосы 3 из мембран эритроцитов (см. разд. 6.2.6). Подобно (Na^+ + H^+)-обменнику, работа (Cl^- + HCO_3^-)-обменника регулируется значением pH_i, но противоположным образом. Его активность возрастает при повышении pH_i (т. е. когда цитозоль становится слишком щелочным), увеличивая скорость выведения HCO_3^- из клетки в обмен на $C1^-$ и, таким образом, понижая pH_i.

Существуют данные, свидетельствующие о том, что (Na^+ + H^+)-обменник может участвовать не только в поддержании pH_i, но и в преобразовании внеклеточных сигналов во внутриклеточные. Например, большинство белковых факторов роста в процессе стимуляции клеточной пролиферации активируют такого рода системы антипорта, увеличивая pH_i от 7,1 или 7,2 до примерно 7,3. По крайней мере в некоторых случаях они делают это косвенным образом, активируя специфическую протеин-киназу (протеинкиназа С - см. разд. 12.3.10), которая в свою очередь фосфорилирует обменник. Это приводит к увеличению сродства регуляторного участка, связывающего H^+, и, следовательно, обменник остается активным и при больших pH. Мутантные клетки, лишенные (Na^+ + + H^+)-обменника, или клетки, обработанные препаратом амилоридом,

ингибирующим его, не способны к ответу на действие факторов роста. Все эти факты наводят на мысль, что активация обменника с последующим увеличением pH_i играет важную роль в инициации клеточной пролиферации. По-видимому, сходным образом увеличение pH_i при оплодотворении яиц морского ежа, вызванное активацией ($Na^+ + H^+$)-обменника, стимулирует синтез ДНК и белка. Остается неясным, какие внутриклеточные белки ответственны за увеличение pH_i в ответ на эту активацию.

6.4.11. В основе межклеточного транспорта растворенных веществ лежит асимметричное распределение белков-переносчиков в клетках эпителия [28]

В плазматической мембране некоторых эпителиальных клеток, участвующих в поглощении пищи в кишечнике, белки-переносчики распределены асимметрично, способствуя, таким образом, **сквозному транспорту** поглощенных растворенных веществ через клетку. Как показано на рис. 6-52, белки, локализованные в плазматической мембране на апикальной (всасывающей) поверхности эпителиальной клетки, осуществляют Na^+-зависимый симпорт, перенося питательные вещества внутрь клетки. В то же время Na^+-независимые белки в базальной и латеральной мембранах позволяют питательным веществам выходить наружу по градиенту их концентраций. Градиент Na^+ на плазматической мембране таких клеток поддерживается ($Na^+ + K^+$)-АТРазой, находящийся в базолатеральной области. По-видимому, сходные механизмы используются эпителиальными клетками кишечника и почек для перекачивания молекул воды из одного внеклеточного пространства в другое.

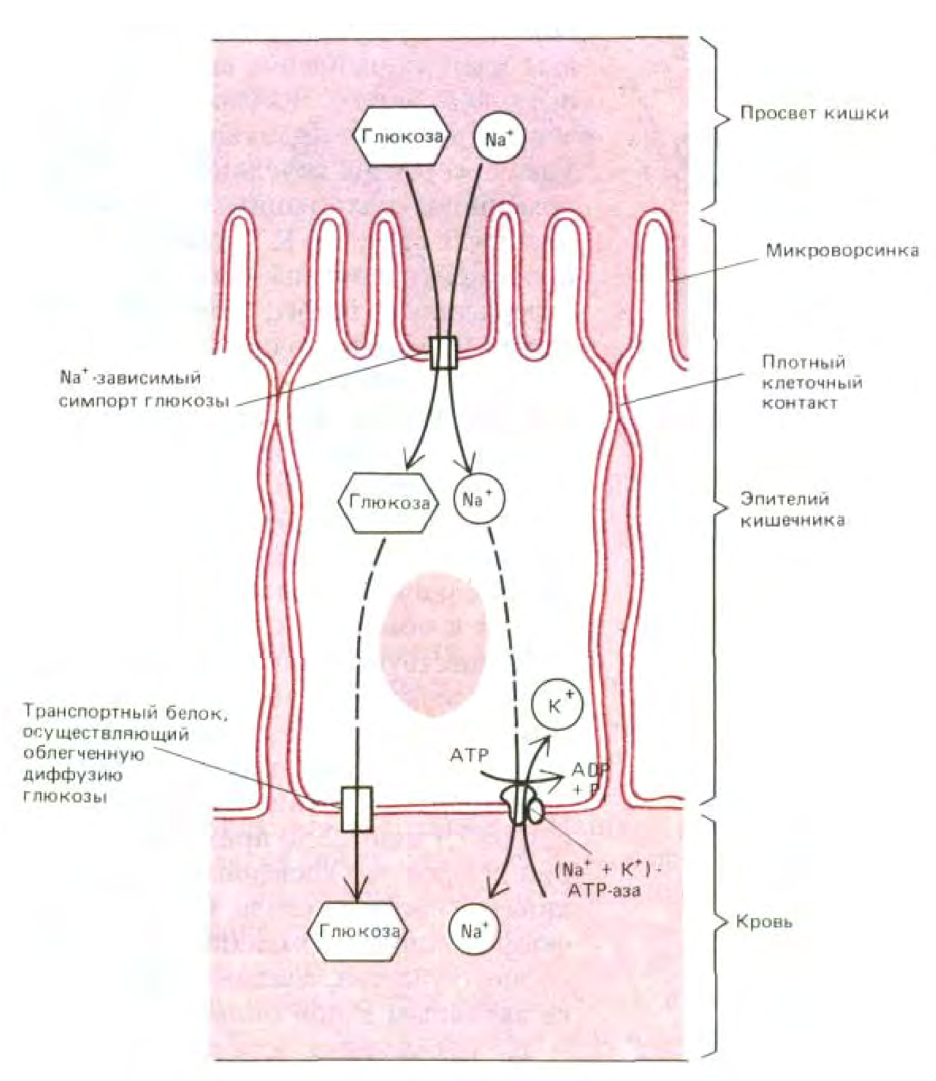


Рис. 6-52. Асимметричное распределение транспортных белков в плазматической мембране клетки эпителия кишечника приводит к сквозному транспорту глюкозы из полости кишки сквозь клетку во внеклеточную жидкость (откуда она поступает в кровь). Глюкоза проникает в клетку через апикальную мембрану посредством Na^+-зависимого симпорта глюкозы и выходит из клетки (по градиенту своей концентрации) путем облегченной диффузии, опосредуемой другим белком-переносчиком глюкозы, локализованном в базальном и латеральном доменах. Градиент Na^+, который приводит в движение симпорт глюкозы, поддерживается ($Na^+ + K^+$)-АТРазой, находящейся в плазматической мембране базолатерального домена; благодаря этому ферменту внутриклеточная концентрация Na^+ сохраняется на низком уровне. Соседние клетки соприкасаются между собой, образуя непроницаемые контакты (называемые *плотными контактами),* обладающие двоякими функциями в представленном здесь процессе транспорта. Эти контакты препятствуют проникновению растворов в щели между клетками эпителия и способствуют возникновению градиента глюкозы через слой эпителиальных клеток. Плотные контакты также служат барьером внутри плазматической мембраны, препятствующим диффузии молекул по поверхности мембраны. Благодаря им различные белки-переносчики удерживаются в соответствующих мембранных доменах (см. рис. 6-36).

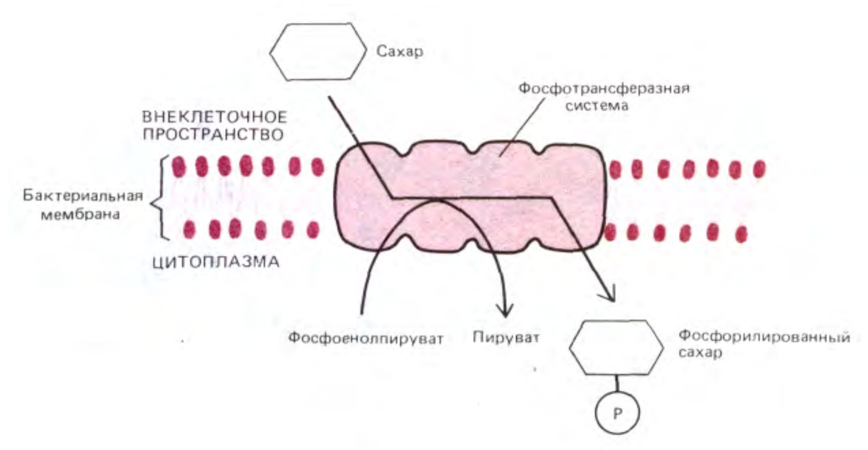


Рис. 6-53. Активный транспорт Сахаров внутрь бактериальных клеток за счет направленного переноса групп. Специальная «фосфотрансферазная система белков» в бактериальной мембране фосфорилирует сахар сразу после переноса его через мембрану. Донором фосфата служит фосфоенолпируват, а не АТР.

Во многих эпителиальных клетках площадь плазматической мембраны намного увеличена за счет существования тысяч **микроворсинок,** выступающих с апикальной поверхности в виде тонких пальцевидных образований (рис. 6-52). Такие микроворсинки могут увеличивать общую площадь всасывающей поверхности в 25 раз, тем самым значительно повышая транспортные возможности клетки. Апикальная поверхность эпителиальной клетки кишечника является также местом, где локализованы иммобилизованные гидролитические ферменты, участвующие в конечных стадиях переваривания пищи. Увеличение площади поверхности эпителия за счет микроворсинок в значительной степени способствует перевариванию и всасыванию пищи.

6.4.12. Активный транспорт в бактериях может идти путем векторного переноса групп [29]

Как мы теперь знаем, активный транспорт в клетках может приводиться в действие светом (например, в бактериородопсине), гидролизом АТР или же ионными градиентами. Четвертый путь, используемый некоторыми бактериями, состоит в том, чтобы молекулу, вошедшую в клетку посредством пассивного транспорта, «поймать в капкан» с помощью химической модификации, которая не дает возможности молекуле выйти обратно тем же путем. Например, сахара после переноса через плазматическую мембрану некоторых бактерий фосфорилируются. В результате такой модификации они становятся заряженными, не могут выйти обратно и поэтому накапливаются в клетке. Более того, вследствие фосфорилирования транспортируемых Сахаров концентрация их нефосфорилированных аналогов внутри клетки остается очень низкой, так что градиент концентрации сахара продолжает «вталкивать» эти молекулы в клетку. Поскольку фосфатные группы переносятся на молекулы растворенных веществ после их транспорта, этот тип активного транспорта называют **векторным или направленным переносом групп.** В большинстве хорошо изученных примеров механизм фосфорилирования достаточно *сложен и тщательно регулируется. В нем принимают* участие по крайней мере четыре отдельных мембранных белка, а в качестве донора высокоэнергетического фосфата используется фосфоенолпируват, а не АТР (рис. 6-53).

6.4.13. Гактерии с двойными мембранами обладают транспортными системами, которые зависят от водорастворимых субстрат-связывающих белков [30]

Как уже упоминалось выше, плазматические мембраны всех бактерий содержат белки-переносчики, использующие градиент ионов H^+ для

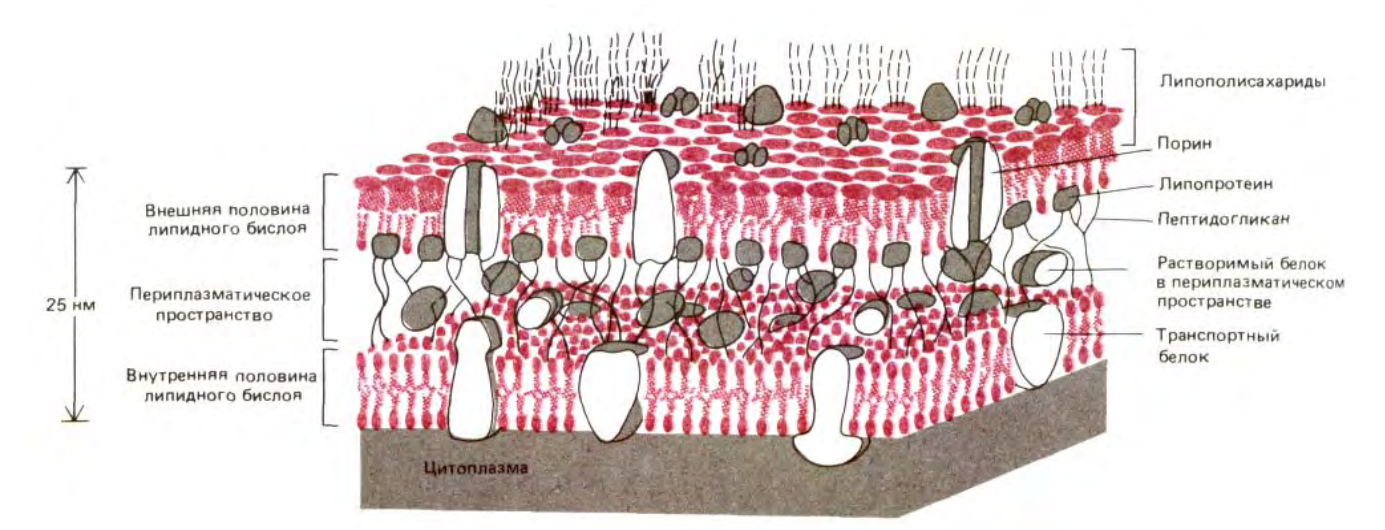


Рис. 6-54. Схематическое изображение небольшого участка двойной мембраны бактерий *E. coli.* Внутренняя мембрана -это клеточная плазматическая мембрана. Между внутренней и внешней липидными бислойными мембранами находится высокопористый, упругий пептидогликан, состоящий из белков и полисахаридов, входящих в клеточные стенки бактерий. Он присоединен к липопротеиновым молекулам внешней мембраны и заполняет *периплазматическое пространство.* В нем содержатся различные растворимые белки. Темные нити на поверхности внешней мембраны представляют собой полисахаридные цепи специальных липополисахаридных молекул, образующих внешний монослой верхней мембраны. Для простоты показаны лишь несколько цепей. Бактерии с двойной мембраной называются *грамотрицателъными,* поскольку они не окрашиваются темно-синей краской по Граму. Бактерии с одной мембраной (но с толстыми клеточными стенками), например, стафиллококки или стрептококки, окрашиваются по Граму и называются грамположительными. Их единственная мембрана аналогична внутренней мембране грамотрицательных бактерий.

перекачки различных питательных веществ внутрь клетки. Однако многие бактерии, включая *E. coli,* имеют еще и окружающую их *внешнюю мембрану,* через которую растворенные вещества с молекулярной массой до 600 дальтон могут относительно свободно проникать через различные каналообразующие белки (известные под общим названием *порины)* (рис. 6-54). У этих бактерий для переноса некоторых Сахаров, аминокислот и мелких пептидов через *внутреннюю (плазматическую) мембрану* существует двухкомпонентная транспортная система, использующая водорастворимые белки, локализованные в периплазматическом пространстве между двумя мембранами. Такие **периплазматические субстрат-связывающие** белки присоединяют к себе специфические молекулы, которые нужно перенести через мембрану. При этом конформация белков меняется, что позволяет им связываться с другим компонентом транспортной системы - трансмембранным белком-переносчиком, находящимся во внутренней мембране (рис. 6-55). По-видимому, субстрат-связывающие белки передают присоединенное к ним растворенное вещество специальному белку-переносчику, который затем использует энергию гидролиза АТР для переноса его через внутреннюю мембрану. Те же самые периплазматические субстрат-связывающие белки служат и в качестве рецепторов в *хемотаксисе* -адаптивном процессе, позволяющем бактериям перемещаться в направлении более высокой концентрации специфического питательного вещества.

Теперь же мы вновь обратимся к каналообразующим белкам.

6.4.14. Белковые каналы образуют в плазматической мембране поры [31]

В отличие от белков-переносчиков **белковые каналы** (или **каналообразующие белки)** формируют в мембранах поры, заполненные водой. При этом каналообразующие белки внешних мембран бактерий (а также митохондрий и хлоропластов) образуют большие, относительно неспецифичные поры, а в плазматических мембранах животных и растительных клеток эти поры малы по размеру и высоко специфичны. Почти все белковые каналы служат для специфического транспорта ионов и обсуждаются здесь под названием **ионных каналов.** Ионные каналы обеспечивают перенос приблизительно 10^6 ионов в секунду, что более чем в 100 раз больше скорости транспорта, осуществляемого любым из известных белков-переносчиков. Ионные каналы никогда не работают совместно

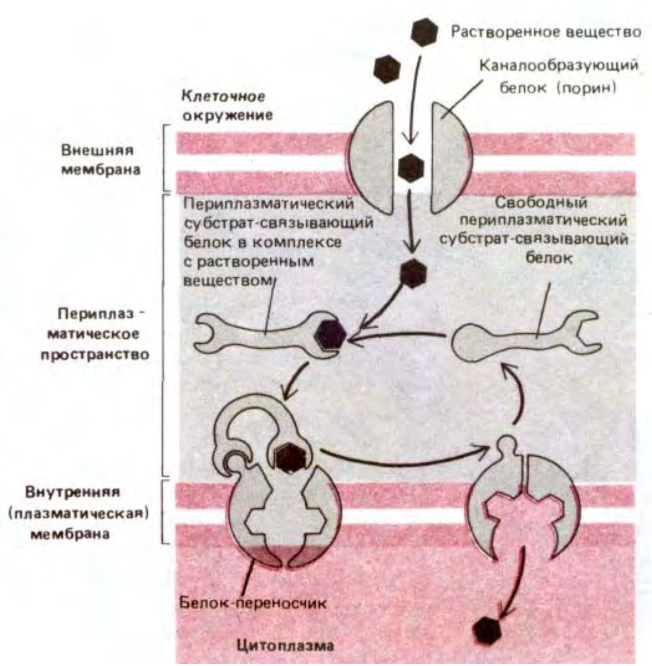


Рис. 6-55. Транспортная система, зависящая от *периплазматических субстрат-связывающих белков* в бактериях с двойной мембраной. Растворенные вещества диффундируют через каналообразующие белки *(порины),* находящиеся во внешней мембране, и связываются с периплазматическими субстрат-связывающими белками. При этом белки испытывают конформационные изменения, приобретая способность связываться с белками-переносчиками плазматической мембраны, которые затем перехватывают субстрат и активно транспортируют его через бислой. Эта стадия опосредуется гидролизом АТР. Пептидогликаны для простоты не показаны. Их пористая структура позволяет субстрат-связывающим белкам и водорастворимым веществам двигаться путем простой диффузии.

с источником энергии; осуществляемый ими транспорт всегда пассивный («с горки») и позволяет специфическим ионам, главным образом Na^+, K^+, Ca^{2+} или Cl^-, диффундировать по их электрохимическим градиентам через липидный бислой.

Белковые каналы плазматической мембраны обладают *ионной селективностью,* т. е. позволяют диффундировать через них только ионам определенного вида. По-видимому, поры должны быть достаточно узкими, чтобы ионы находились в тесном контакте с их стенками и чтобы проходить могли только те из них, которые имеют подходящий размер и заряд. Скорее всего на этом пути ионам приходится терять большинство или даже все ассоциированные с ними молекулы воды. Эти два обстоятельства накладывают ограничение на скорость диффузии через канал и делают его селективным фильтром, допускающим прохождение только ионов определенного типа. Таким образом, при увеличении концентрации ионов их поток через канал возрастает пропорционально, но лишь до определенного предела.

Другой особенностью, отличающей ионные каналы от простых пор, заполненных водой, является то, что они открыты не все время. Как показано на рис. 6-56, каналы имеют «ворота», которые открываются на

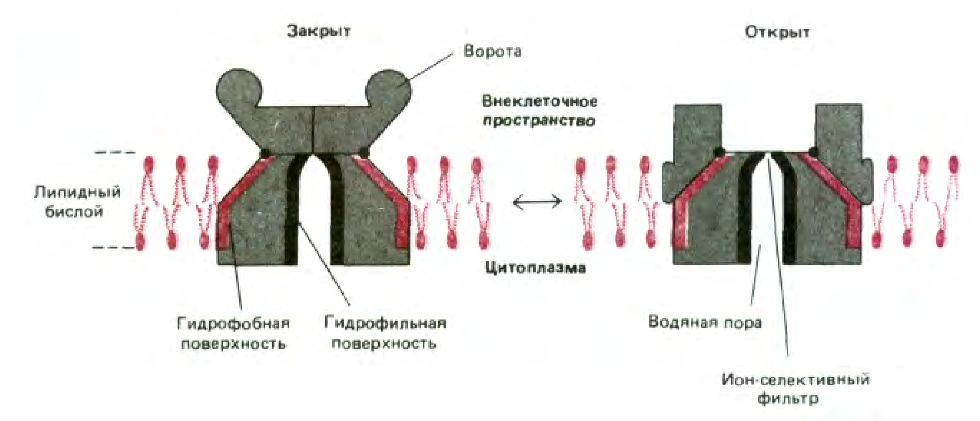


Рис. 6-56. Схематическое изображение воротного ионного канала в закрытой и открытой конформациях. Трансмембранный белок, показанный в разрезе, образует в липидном бислое заполненную водой сквозную пору при открытых воротах. В состав стенок поры входят, видимо, гидрофильные аминокислотные остатки. Гидрофобные остатки взаимодействуют с липидным бислоем. Ионная селективность канала определяется самым узким его местом. Временное открытие ворот вызывается специфическим возмущением мембраны, различным для разных каналов (обсуждается в тексте). Положение ворот и ионного селективного фильтра для большинства каналов неизвестно.

короткое время, а затем закрываются. В большинстве случаев ворота открываются в ответ на специфические возмущения мембраны. Среди них наиболее известны в настоящее время изменение мембранного потенциала *(потенциал-зависимые воротные каналы),* механическая стимуляция *(механически открываемые каналы - см.* разд. 19.6.3) или связывание сигнальных молекул *(лиганд-зависимые воротные каналы).* Сигнальными лигандами могут быть либо внеклеточные посредники, называемые *нейротрансмиттерами или нейромедиаторами (нейротрансмиттер-зависимые каналы),* либо внутриклеточные посредники, например ионы *(ион-зависимые каналы - см.* разд. 21.1.1.), нуклеотиды *(нуклеотид-зависимые каналы - см.* разд. 3.3.5) или GTP-связывающие регуляторные белки (G-белок-регулируемые каналы - см. разд. 12.3.12).

На сегодняшний день известно уже около 50 видов ионных каналов. И в настоящее время продолжают открывать все новые их виды. Ионные каналы ответственны за электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток; они осуществляют большинство форм передачи электрических сигналов в нервной системе. Отдельная нервная клетка обычно содержит более пяти видов ионных каналов. Однако такие каналы присущи не только электрически возбудимым клеткам. Они есть у всех животных клеток и обнаруживаются в некоторых клетках растений и микроорганизмов. Именно эти каналы, например, ответственны за закрывание листьев в ответ на раздражение у мимозы или за изменение направления движения на обратное у одноклеточного *Paramecium.*

Видимо, наиболее распространенными ионными каналами являются те, которые проницаемы главным образом для K^+ . Они обнаружены в плазматических мембранах почти всех животных клеток. Поскольку для их открывания скорее всего не требуется специфических мембранных возмущений, их называют иногда *калиевыми проточными каналами.* Эти каналы играют ключевую роль в установлении *мембранного потенциала - разности* электрического напряжения, наблюдающейся на двух сторонах всех типов мембран.

6-24
6-26

6.4.15. Мембранный потенциал зависит от K^+-проточных каналов и градиента K^+ через мембрану [32]

Мембранный потенциал зависит от распределения ионов на обеих сторонах мембраны. Выше уже шла речь о том, что (Na^+ +K^+)-АТРаза способствует установлению осмотического равновесия в клетке за счет поддержания низкой внутриклеточной концентрации Na^+ . Из-за низкой концентрации натрия внутри клетки необходим избыток других катионов, чтобы сбалансировать заряд фиксированных клеточных анионов - отрицательно заряженных органических молекул, находящихся внутри клетки. Эту роль выполняют главным образом ионы калия благодаря **K^+-проточным каналам,** которые обеспечивают свободный переход этих ионов через мембрану и позволяют им засасываться внутрь клетки за счет отрицательного заряда фиксированных анионов (даже при отсутствии какой бы то ни было работы (Na^+ + K^+)-АТРазы. Таким образом, устанавливается равновесие, при котором электрическая сила, «втягивающая» ионы калия внутрь клетки, уравновешивается стремлением K^+ вытекать из клетки по градиенту концентрации. Мембранный потенциал является выражением этой электрической энергии и его величина может быть рассчитана из крутизны градиента концентрации K^+, необходимой для уравновешивания электрических сил. Поясним на таком примере. Предположим, что электрический градиент через плазматическую мембрану первоначально отсутствует (т. е. мембранный потенциал равен нулю), но концентрация K^+ внутри клетки выше (для уравновешивания

УРАВНЕНИЕ НЕРНСТА И ПОТОК ИОНОВ

Поток любых ионов через белковый мембранный канал зависит от их электрохимического градиента. Этот градиент представляет собой комбинацию двух компонентов: градиента напряжения и градиента концентрации ионов через мембрану. Когда эти две составляющие уравновешивают друг друга, электрохимический градиент для данного иона равен нулю. Это значит, что суммарный поток ионов через канал будет отсутствовать. Градиент напряжения (мембранный потенциал), при котором наблюдается такое равновесие, называется **потенциалом равновесия.** Он может быть вычислен из уравнения, которое будет выведено ниже и называется **уравнением Нернста.**

Уравнение Нернста

$V = RT/ zF\ lnC_0/C_i$,

где V — потенциал равновесия в вольтах (потенциал внутри клетки минус потенциал снаружи),

C_0 и C_i — внешняя и внутренняя концентрация ионов, соответственно,

R — универсальная газовая постоянная (2 кал х моль$^{-1}$ х °К)

Т — абсолютная температура (°К),

F — постоянная Фарадея (2,3 х 10^4 кал х В$^{-1}$ х моль$^{-1}$) ,

z — заряд иона.

Уравнение Нерста выводится следующим образом: молекулы в растворе всегда движутся из области с высокой концентрацией в область с низкой. Следовательно, движение по градиенту концентрации сопровождается понижением свободной энергии ($\Delta G < 0$), тогда как движение против градиента концентрации ведет к возрастанию свободной энергии ($\Delta G > 0$). (Понятие свободной энергии вводится и обсуждается на схеме 2-7.). Изменение свободной энергии на моль растворенного вещества, перенесенного через мембрану (ΔG_{conc}) равно — RT $\ln C_0/C_i$. Если растворенным веществом являются ионы, то их перемещение внутрь клетки через мембрану (со скачком напряжения на ней, равным V) будет вызывать дополнительное изменение свободной энергии (на моль перемещенного вещества) $\Delta G = -zFV$. При условии равновесия $\Delta G_{conc} + \Delta G_{volt} = 0$ распределение ионов на двух сторонах Мембраны будет равновесным. Таким образом,

$zF - RT \ln C_0/C_i = 0$,

и, следовательно,

$V = RT/zF \ \text{In}\ C_0/C_i = 2{,}3\ RT/zF\ \text{Ig}\ C_o/C_i$.

Для одновалентных ионов

2,3 RT/F - 58 мВ при 20°С и 61,5 мВ при 37°С.

Поэтому, когда мембранный потенциал имеет значение 61,5 lg($[K^+]_0$/ $[K^+]$,) милливольт (-89 мВ, когда $[K^+]_o$ = 5 мМ и $[K^+]$ = 140 мВ), он является потенциалом равновесия для K^+ (V_k), при котором отсутствует суммарный ток К через мембрану. Аналогично, когда мембранный потенциал имеет значение 61,5 Ig ($[Na^+]_o$/ $[Na^+]_i$) — равновесный потенциал для Na^+ (V_{Na}), отсутствует ток Na^+. Для типичной клетки V_k колеблется от — 70 мВ до — 100 мВ, а V_{Na} от +50 мВ до +65 мВ.

Для какого-либо отдельного мембранного потенциала

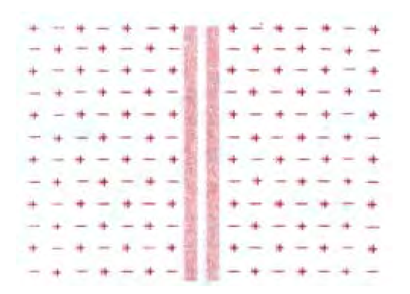
V_M, суммарная сила, стремящаяся вывести отдельный тип ионов из клетки, пропорциональна разнице между V_M и равновесным потенциалом для этих ионов. Например, для K^+ : V_M — V_k и для Na^+: V_M — $V_{Na.}$ Реальный ток, осуществляемый каждым видом ионов зависит не только от движущей силы, но также и от степени проницаемости мембраны для данного иона через каналы, которая есть функция *проводимости* каналов для данного иона. Если проводимость набора каналов для K^+ и Na^+ соответственно g_K и g_{Na}, из закона Ома следует, что токи K^+ и Na^+ соответственно будут равны g_K ($V_м$ - $V_к$) и g_{Na} (V_M - V_{Na}) (проводимость есть величина, обратная сопротивлению, а единица измерения, обратная ому, есть сименс, S). Большинство индивидуальных ионных каналов имеет проводимость в пределах 1 — 150 х 10^{-12} S или 1 — 150 *pS*). При мембранном потенциале покоя в большинстве клеток К -каналы являются основным типом открытых каналов. Поэтому g_k доминирует в общей проводимости мембраны. В процессе возникновения потенциала действия в нервных или мышечных клетках открывается на короткое время множество потенциал-зависимых Na^+-каналов, в результате проводимость g_{Na} становится доминирующей в общей проводимости мембраны.

Схема 6-2. Вывод уравнения Нернста.

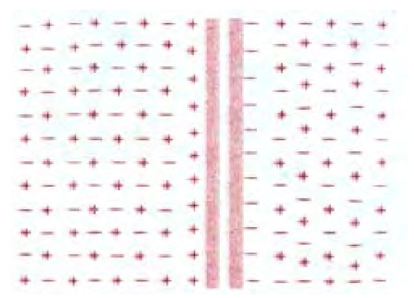
заряда фиксированных анионов), чем снаружи. В этом случае ионы калия будут стремиться выйти из клетки через проточные K^+-каналы по направлению градиента их концентрации. Если ионы выйдут из клетки, то внутри останется отрицательный заряд и, таким образом, возникнет электрическое поле, другими словами, мембранный потенциал, стремящийся вернуть ионы K^+ в клетку. Вытекание ионов калия прекратится, как только образовавшийся мембранный потенциал достигнет значения, при котором электрическая движущая сила, действующая на ионы калия, точно уравновесит действие градиента концентрации K^+, т.е. когда электрохимический градиент ионов калия окажется равным нулю. Таким же образом создается одновременно и равновесие для ионов Cl^-, но, поскольку их заряд отрицательный, они удерживаются вне клетки. Равновесные условия, при которых отсутствует электрический ток через мембрану, определяют клеточный **мембранный потенциал покоя.** Существует простая, но очень важная формула, количественно выражающая условия равновесия - **уравнение Нернста.** Как показано на схеме 6-2, она позволяет рассчитать мембранный потенциал покоя, если известно соотношение внутренней и внешней концентраций ионов.

Для того чтобы установился мембранный потенциал, достаточно перенести через мембрану совсем небольшое количество ионов. Таким образом, мембранный потенциал можно представить себе как перемещение зарядов, оставляющее концентрации ионов практически неизменными. В результате происходит лишь небольшое перераспределение числа положительно и отрицательно заряженных ионов между сторонами мембраны (рис. 6-57). Более того, это перемещение зарядов происходит очень быстро, за несколько миллисекунд или даже быстрее.

Рассмотрим, что случится, если инактивировать (Na^+ + K^+)-АТРазу. Прежде всего произойдет небольшое быстрое падение мембранного потенциала, поскольку (Na^+ + K^+)-насос является электрогенным и в активном состоянии вносит свой вклад в мембранный потенциал (см. разд. 6.4.6). Однако выключение этого насоса не приводит к исчезновению главного компонента потенциала покоя, основанного на механизме уравновешивания ионами калия (как описано выше). Он существует до тех пор, пока концентрация Na^+ внутри клетки остается низкой, т.е. многие минуты. Но поскольку плазматическая мембрана хоть и плохо, все же проницаема для ионов Na^+ , то Na^+ будет медленно входить внутрь клетки по своему электрохимическому градиенту. Приток натрия уменьшает мембранный потенциал и, таким образом, вызывает дополнительный отток ионов K^+ из клетки. В это время нарушается осмотическое равновесие (см. разд. 6.4.6), но, если клетка не лопнула, со временем установится новое состояние равновесия между ионами Na^+, K^+ и $C1^-$. При этом мембранный потенциал будет намного ниже, чем в нормальной клетке с активным (Na^+ + K^+)-насосом.



Точное равенство зарядов на обеих сторонах мембраны; мембранный потенциал = 0



Несколько положительно заряженных ионов (цветные) пересекли мембрану справа налево, оставив с другой стороны отрицательно заряженные противоионы (цветные); при этом мембранный потенциал отличен от нуля

Рис. 6-57. Небольшой поток ионов несет достаточный заряд для создания большого изменения мембранного потенциала. Ионы, определяющие мембранный потенциал, располагаются вблизи мембраны, удерживаясь за счет взаимодействия с противоионами другой стороны мембраны. Для типичной клетки 1 микрокулон заряда (6 x 10^{12} одновалентных иона) на 1 $см^2$ мембраны, перенесенный с одной стороны на другую, изменит мембранный потенциал примерно на I В. Это значит, что для сферической клетки диаметром 10 мкм вытекание из клетки лишь 1/100000 доли ионов K^+ будет изменять потенциал на 100 мВ.

Разность потенциалов на сторонах плазматической мембраны клетки, находящейся в покое, варьирует в зависимости от организма или типа клеток от — 20 мВ до — 200 мВ. Хотя градиент K^+ всегда вносит наибольший вклад в этот потенциал, значительным эффектом обладают также и градиенты других ионов (плюс неравновесные эффекты ионных насосов). Чем более проницаема мембрана для данного иона, тем в большей степени мембранный потенциал зависит от равновесных условий для этого иона. Следовательно, практически при любом изменении проницаемости мембраны для ионов происходит изменение и мембранного потенциала. Это ключевой принцип, связывающий электрическую возбудимость клеток с активностью ионных каналов.

6-25

6.4.16. Потенциал-зависимые воротные ионные каналы ответственны за электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток [33]

В плазматических мембранах электрически возбудимых клеток (главным образом нервных и мышечных) содержится множество **потенциал-зависимых воротных ионных каналов,** ответственных за генерацию **потенциалов действия** - быстрых, скоротечных самораспространяющихся электрических возбуждений мембраны. Этот процесс начинается при *деполяризации* мембраны - смещении мембранного потенциала к менее отрицательному значению. Стимул, который вызывает моментальную частичную деполяризацию, сразу же открывает **потенциал-зависимые воротные Na^+-каналы,** что позволяет небольшому количеству Na^+ войти в клетку. Приток положительных зарядов в свою очередь деполяризует мембрану еще больше, приводя к открыванию других Na^+-каналов, пропускающих дополнительное количество ионов натрия и, таким образом, дальнейшую деполяризацию. Этот процесс продолжается до тех пор, пока потенциал локального участка мембраны не изменится от своего значения покоя около — 70 мВ до равновесного потенциала Na^+, равного примерно + 50 мВ (см. схему 6-2). При этом значении, когда суммарный электрохимический потенциал Na^+ равен нулю, клетки пришли бы в новое состояние равновесия (или покоя), в котором все натриевые каналы перманентно открыты, если бы открытая конформация канала была стабильной. Однако клетки защищены от такого непрерывного электрического спазма, поскольку Na^+-каналы находятся под контролем автоматического инактивирующего механизма. Они быстро закрываются после открытия, несмотря на деполяризацию мембраны. В таком *инактивированном* состоянии каналы не могут вновь открыться до тех пор, пока не пройдет несколько миллисекунд после падения мембранного потенциала до первоначального отрицательного значения. На рис.

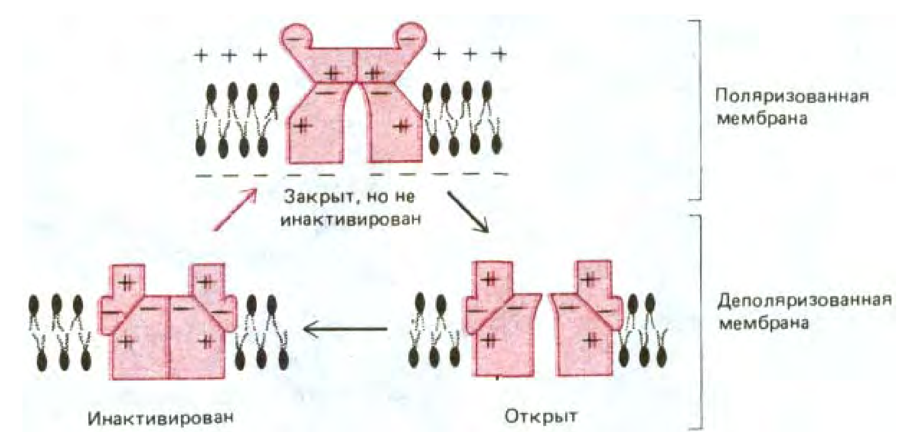


Рис. 6-58. Потенциал-зависимый Na^+-канал может находиться в одном из трех по крайней мере состояний (конформаций). Внутренние силы, представленные здесь в виде взаимодействия зарядов, находящихся на различных сторонах канала, стабилизируют каждое состояние и защищают от влияния небольших возмущений. Однако взаимодействия с другими молекулами могут привести к переходу из одного состояния канала в другое. Состояние с наименьшей энергией определяется мембранным потенциалом, так как различные конформаций имеют различное распределение зарядов. В состоянии покоя (мембрана сильно поляризована) канал *закрыт, но не инактивирован.* Это наиболее стабильное состояние с наименьшей свободной энергией. При деполяризации мембраны более низкой энергией будет обладать *открытая* конформация и, следовательно, канал откроется. Но свободная энергия *инактивированного* состояния еще ниже и после некоторого случайного периода времени в открытом состоянии канал переходит в инактивированное состояние. Таким образом, открытая конформация соответствует метастабильному состоянию, существующему недолго. *Черные стрелки* показывают последовательность событий при деполяризации мембраны, а *красная стрелка* обозначает возврат в первоначальное состояние с наименьшей свободной энергией после реполяризации мембраны.

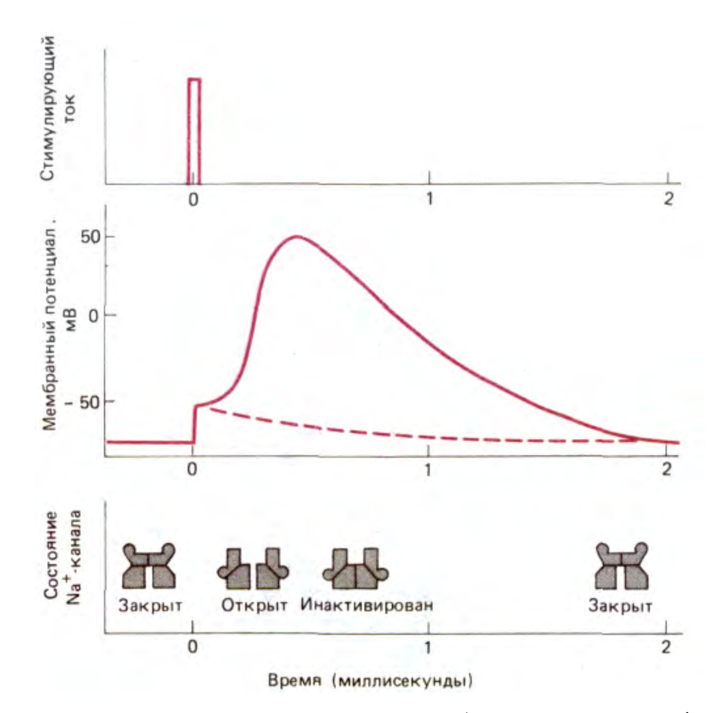


Рис. 6-59. Индукция потенциала действия коротким электрическим импульсом (показан на верхнем графике). Импульс частично деполяризует мембрану (средний график). Сплошная линия на графике мембранного потенциала показывает возникновение потенциала действия при открывании и последующей инактивации потенциал-зависимых Na^+-каналов. Мембранный потенциал автоматически возвращается к своему первоначальному значению — 70 мВ при закрытии Na^+-каналов благодаря непрерывному вытеканию K^+ через К -каналы. Возникновение второго потенциала действия невозможно до тех пор, пока Na^+-каналы (их состояния показаны внизу) не вернутся в закрытое, но не инактивированное состояние (см. рис. 6-58). До этого мембрана остается нечувствительной к раздражению. Прерывистая линия показывает релаксацию мембранного потенциала при слабых воздействиях, не приводящих к открыванию каналов.

6-58 схематически изображены эти три различных состояния потенциал-зависимого воротного Na^+-канала - закрытое, но не инактивированное, открытое и инактивированное. Рис. 6-59 показывает, как этот канал работает при повышении и понижении потенциала действия.

Рассмотренный выше процесс образования потенциала действия относится лишь к небольшому участку плазматической мембраны. Однако самоусиливающейся деполяризации этого участка достаточно для деполяризации соседних областей мембраны, которые вовлекаются при этом в тот же цикл генерации потенциала действия. Таким образом, потенциал действия распространяется от первоначального участка деполяризации по всей плазматической мембране. Более детальное рассмотрение функций и свойств потенциала действия приводится в гл. 19.

В нейронах и мышечных клетках имеется несколько тысяч потенциал-зависимых Na^+-каналов. Ток, протекающий через мембрану, - это сумма всех микротоков через каждый канал. Суммарный ток можно записать с помощью микроэлектрода (см. разд. 19.2.3). Однако существует возможность зарегистрировать и токи, протекающие через индивидуальные каналы. Это делают с помощью специальной техники, позволяющей выделить совсем небольшой участок мембраны, который содержит лишь несколько каналов, и записать затем протекающие через него токи. Такая методика *(patch-clamp)* дает более детальную картину работы этих каналов.

6-27

6.4.17. Регистрация токов, проходящих через изолированный участок мембраны, показывает, что индивидуальные Na^+-каналы открываются по принципу «все или ничего» [34].

Разработка метода patch-clamp позволила существенно продвинуться в изучении ионных каналов. С помощью этого метода можно анализировать транспорт через единичную молекулу белкового канала, находящегося на маленьком участке мембраны (рис. 6-60), записывать сигналы

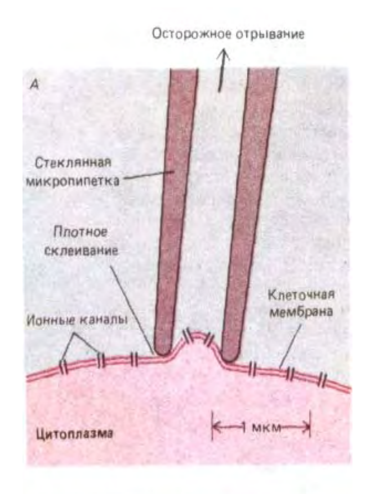
от ионных каналов любых типов клеток, включая и электрически невозбудимые. Многие из этих клеток, например дрожжевые, слишком малы, чтобы исследовать их традиционным методом электрофизиологов - введением внутриклеточных электродов.

Регистрация сигналов методом patch-clamp показала, что индивидуальные Na^+-каналы открываются по принципу «все или ничего». В открытом состоянии их проводимость не меняется, а времена открывания и закрывания случайны. Поэтому суммарный ток, протекающий через большую популяцию Na^+-каналов мембраны целой клетки дает представление не о *степени* открытия индивидуального канала, а лишь о средней *вероятности* того, что он открыт (рис. 6-61).

Явление потенциал-зависимого открывания и закрывания можно понять исходя из простых физических принципов. Внутри покоящейся нервной или мышечной клетки электрический потенциал на 50- 100 мВ ниже, чем снаружи. Такая разность потенциалов на двух сторонах мембраны может показаться незначительной, однако, учитывая, что толщина мембраны составляет всего лишь около 5 нм, градиент оказывается равным примерно 100 000 В/см. Следовательно, мембранные белки находятся в очень сильном электрическом поле. Естественно, мембранные белки, как и все другие, содержат на своей поверхности некоторое количество заряженных групп. Электрическое поле увеличивает силы, действующие на структуру молекулы. На многие мембранные белки изменения электрического поля через мембрану не оказывают значительного влияния. Ионные каналы, однако, приобрели в процессе эволюции тонкую сбалансированную чувствительность к электрическому полю: они могут принимать несколько альтернативных конформаций, стабильность которых зависит от величины электрического поля. Малые возмущения не отражаются на конформации каналов, но при достаточно сильных воздействиях, например случайных тепловых движениях окружающих молекул, может произойти и переход к другой конформации (см. рис. 6-58).

Функции потенциал-зависимых Na^+-каналов специфически блокируются двумя паралитическими ядами: *тетродотоксином (TTX),* получаемым из иглобрюхих рыб и *сакситоксином,* который выделяют из определенных видов морских динофлагеллят. Из-за высокой аффинности и специфичности эти токсины оказались незаменимыми для фармакологических исследований, подсчета числа Na^+-каналов в мембране и для очистки этих каналов. Было показано, что в плазматической мембране клеток скелетных мышц находится лишь несколько сотен Na^+ -каналов на 1 $мкм^2$, т.е. один канал на 10 000 молекул фосфолипидов. Несмотря на такую малую плотность каналов, эти мембраны электрически возбудимы, поскольку каждый канал обладает высокой проводимостью, пропуская более 8000 ионов за 1 миллисекунду.

В 1984 году была определена нуклеотидная последовательность ДНК, детерминирующая образование потенциал-зависимого Na^+ -канала (у угря). Установлено, что она кодирует одну длинную полипептидную цепь (около 1800 аминокислотных остатков), содержащую четыре гомологичных трансмембранных домена (каждый из которых имел в своем составе шесть предполагаемых α-спиралей, пронизывающих мембрану). Эти спирали, по-видимому, взаимодействуют друг с другом, образуя стенки поры, заполненной водой. Совсем недавно был секвенирован ген, кодирующий потенциал-зависимый Ca^{2+}-канал. Оказалось, что это также длинный полипептид, первичная структура которого высоко гомологична обнаруженной для Na^+-канала. Весьма вероятно, что потенциал-зависимые ионные каналы относятся к семейству эволюционно и структурно родственных белков. В каждом из этих каналов один из



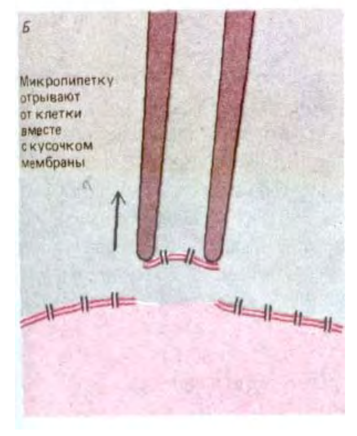


Рис. 6-60. Запись сигналов методом patch-clamp. Благодаря плотному соединению между микропипеткой и мембраной ток может течь только через каналы, имеющиеся в участке мембраны, закрывающей кончик пипетки. Запись протекающего тока можно сделать как в случае *А* (в интактной клетке), так и в случае *Б* (удалив участок мембраны). Преимущества варианта *Б* состоят в легкости изменения условий с любой стороны мембраны для изучения воздействия различных растворов на поведение канала. Ориентацию удаленного участка мембраны можно изменить на противоположную (см. также рис. 4-33 и 4-34).

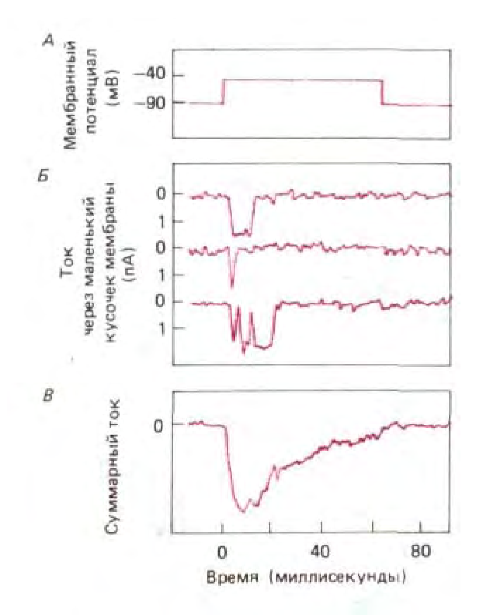


Рис. 6-61. Запись тока, протекающего через единичный потенциал-зависимый Na^+-канал, находящийся в крошечном участке плазматической мембраны мышечной клетки эмбриона крысы (см. рис. 6-60). Мембрану деполяризуют импульсом *(А).* Три графика тока *(Б)* получены в трех экспериментах с одним и тем же участком мембраны. Каждое существенное изменение тока соответствует открытию и закрытию одного канала. Сравнение показывает, что время открытию и закрытию может существенно варьировать, при этом скорость протекания зарядов через канал остается практически постоянной. Маленькие флуктуации при записи тока являются электрическим шумом записывающей аппаратуры. Суммарный ток, записанный в 144 повторяющихся экспериментах, показан на *В.* Он эквивалентен току Na^+ через относительно большой участок мембраны, содержащий 144 канала. Сравнение *Б* и *В* показывает, что суммарный ток отражает вероятность открывания индивидуального канала. Эта вероятность со временем уменьшается, так как каналы деполяризованной мембраны переходят в инактивированную конформацию. Кинетика открывания и инактивации каналов мышечной клетки эмбриона намного медленнее, чем у типичной нервной клетки. (По данным J. Patlak и R. Horn, J. Gen. Physiol., 79, 333-351, 1982, с разрешения Rockefeller University Press.)

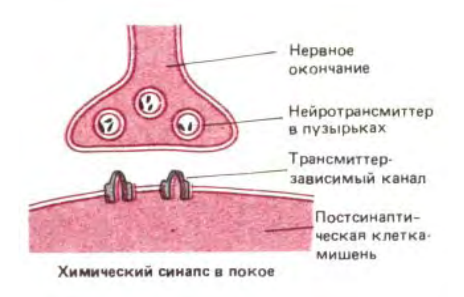
предполагаемых трансмембранных сегментов содержит положительно заряженные аминокислотные остатки, разделенные между собой регулярными промежутками. Не исключено, что эти остатки вместе обладают функцией сенсора потенциала, обеспечивая открывание канала в ответ на достаточную деполяризацию мембраны (см. рис. 6-58).

Намного больше известно о структуре другого класса ионных каналов, открывающихся в ответ на связывание специфических нейротрансмиттеров, а не на изменения мембранного потенциала. Эти *трансмиттер-зависимые ионные каналы* также принадлежат к одной группе родственных белков. Однако в отличие от потенциал-зависимых Na^+ - и Ca^{2+}-каналов, каждый из которых образован одной длинной полипептидной цепью, все изученные трансмиттер-зависимые ионные каналы построены из нескольких гомологичных субъединиц.

6.4.18. Ацетилхолиновый рецептор - это трансмиттер-зависимый катионный канал [35]

Трансмиттер-зависимые ионные каналы приспособлены для превращения внеклеточных химических сигналов в электрические сигналы. Они располагаются обычно в специализированных соединениях (называемых *химическими синапсами),* расположенных между нервными клетками и клетками-мишенями. Эти каналы концентрируются на плазматической мембране клетки-мишени в области синапса. Каналы способны открываться на некоторое время в ответ на связывание *нейротрансмиттера,* высвобождаемого нервным окончанием. При этом меняется проницаемость постсинаптической мембраны клетки-мишени (рис. 6-62). В отличие от потенциал-зависимых каналов, ответственных за возникновение потенциалов действия, трансмиттер-зависимые каналы относительно нечувствительны к мембранному потенциалу и поэтому неспособны к самоусиливающемуся возбуждению. Вместо этого они изменяют проницаемость мембраны и, следовательно, влияют на мембранный потенциал. Величина этого изменения зависит от того, сколько трансмиттера высвободилось в синапсе и в течение какого времени он там присутствует. Ясно, что потенциал действия может возникнуть только при условии, что потенциал-зависимые каналы также присутствуют в этой же мембране клетки-мишени.

Кроме характерной ионной селективности каждый трансмиттер-зависимый канал обладает высокоспецифичным участком связывания своего



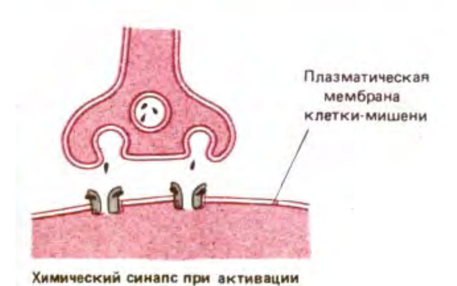


Рис. 6-62. Химический синапс. Приходящий к нервному окончанию потенциал действия стимулирует высвобождение нейротрансмиттера, содержащегося в секреторных пузырьках и высвобождаемого из клетки при слиянии пузырьков с плазматической мембраной нервного окончания. Высвобожденный нейротрансмиттер связывается с трансмиттер-зависимыми ионными каналами, сконцентрированными на плазматической мембране постсинаптической клетки, и открывает их. В результате тока ионов изменяется мембранный потенциал клетки-мишени. Таким образом происходит передача нервного сигнала.

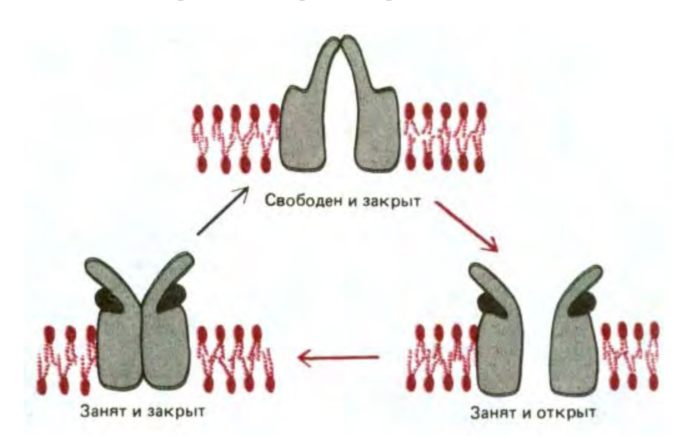


Рис. 6-63. Три конформации ацетилхолинового рецептора. Связывание двух молекул ацетилхолина открывает ворота трансмиттер-зависимого ионного канала. Но, по-видимому, даже при связанном ацетилхолине рецептор остается открытым непродолжительное время, а затем закрывается. Ацетилхолин отсоединяется от рецептора, возвращая его в первоначальное состояние.

нейротрансмиттера. Примером наиболее изученного трансмиттер-зависимого канала может служить **ацетилхолиновый рецептор** клеток скелетных мышц. Этот канал временно открывается при действии ацетилхолина, нейротрансмиттера высвобождаемого из нервного окончания в *нервно-мышечное соединение* (см. разд. 19.3.1). Ацетилхолиновый рецептор занимает особое место в истории изучения ионных каналов. Он был первым ионным каналом, выделенным в чистом виде, именно у него впервые была определена полная аминокислотная последовательность, ацетилхолиновый рецептор оказался первым каналом, для которого удалось добиться функциональной активности после реконструкции в синтетическом липидном бислое, и, наконец, первым каналом, у которого был записан электрический сигнал, получаемый при открывании одного канала. Ген этого канала также оказался первым из генов белков-каналов, которые были выделены, клонированы и секвенированы. Успех в изучении этого рецептора стал возможен по двум по крайней мере причинам. Во-первых, существует необычайно богатый источник для его выделения из электрических органов электрических рыб и скатов. Эти органы представляют собой модифицированные мышцы, приспособленные для того, чтобы вызвать у жертвы электрический шок. Во-вторых, некоторые нейротоксины типа α-бунгаротоксина из яда определенных змей с высокой эффективностью (K_a = 10^9 л/моль) и специфичностью связываются с этим рецептором и могут быть использованы для его очистки методом аффинной хроматографии. Благодаря применению флуоресцентно или радиоактивно меченного α-бунгаротоксина показано, что ацетилхолиновые рецепторы плотно упакованы в плазматической мембране мышечных клеток в месте нейромышечного соединения (около 20000 рецепторов на мкм^2), а в других местах той же мембраны находится лишь несколько таких рецепторов.

Ацетилхолиновый рецептор представляет собой гликопротеин, состоящий из пяти трансмембранных полипептидов. Два из них принадлежат к одному типу, а три остальных - к другому. Они кодируются четырьмя различными генами. Поскольку четыре этих гена обнаруживают тесную гомологию, предполагают, что все они произошли от одного гена-предшественника. Два идентичных полипептида в пентамере имеют участки связывания ацетилхолина. При связывании двух молекул трансмиттера с пентамерным комплексом происходит индуцированное конформационное изменение, приводящее к открыванию канала. Канал открывается примерно на 1 миллисекунду, а затем опять закрывается. По-видимому, как и для потенциал-зависимого Na^+-канала, открытая форма является короткоживущей и быстро переходит в закрытое состояние с меньшей свободной энергией (рис. 6-63). После

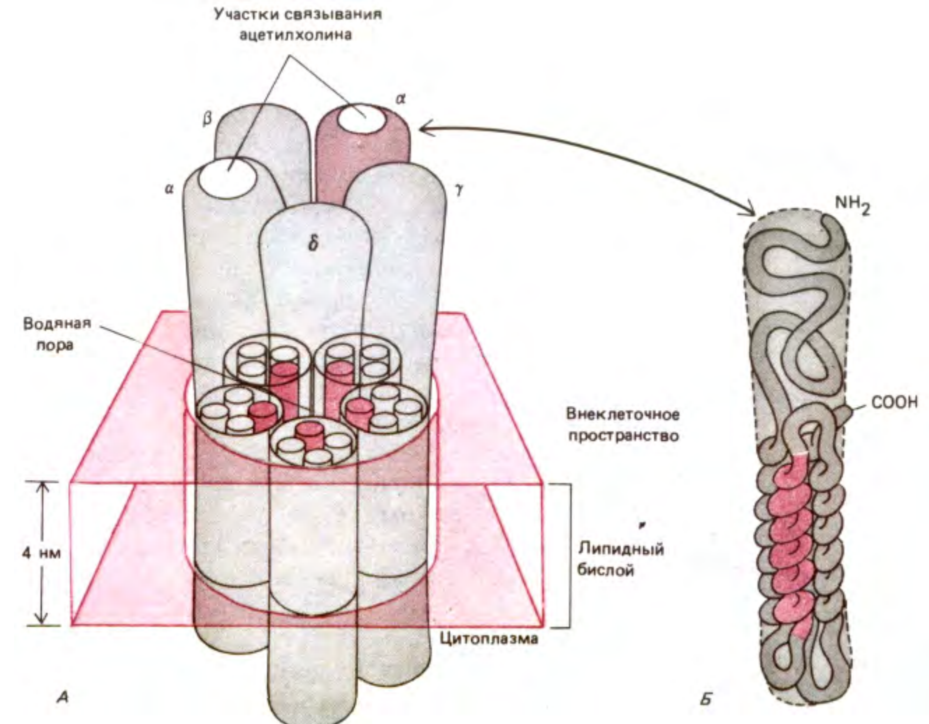


Рис. 6-64. Одна из моделей образования трансмембранной поры, заполненной водой, из пяти гомологичных субъединиц (α, α, β, γ, δ) ацетилхолинового рецептора *(А)*. Обратите внимание, что обе α-субъединицы содержат участок связывания ацетилхолина и что основная масса рецептора находится во внеклеточном пространстве. Каждая субъединица состоит из ~500 аминокислотных остатков. M_r рецептора ~ 300 000 Да. Предполагается, что полипептидная цепь каждой субъединицы пересекает липидный бислой в виде четырех α-спиралей (Б). Одна из спиралей (показана в цвете) содержит более полярные аминокислотные остатки, чем другие. Она, видимо, и входит в состав стенки водяной поры при объединении пяти субъединиц *(А)*.

этого молекулы ацетилхолина диссоциируют из комплекса с рецептором и гидролизуются специфическим ферментом (ацетилхолинэстеразой). Освободившись от связанного нейротрансмиттера, ацетилхолиновый рецептор возвращается к исходному состоянию покоя.

Для изучения структуры ацетилхолинового рецептора были использованы методы электронной микроскопии и малоугловой дифракции рентгеновских лучей, однако точный ответ на вопрос, как образуется трансмембранный гидрофильный канал, до сих пор не получен. Было предложено несколько моделей, основанных главным образом на аминокислотной последовательности субъединиц. Одна из моделей представлена на рис. 6-64. То, что кластеры отрицательно заряженных аминокислотных остатков выстилают отверстие канала, объясняет, по-видимому, известный факт, что отрицательно заряженные ионы не способны проходить через канал, а положительно заряженные ионы с размером до 0,65 нм могут это делать. Через канал проходят преимущественно ионы Na^+ и K^+, а также некоторое количество Ca^{2+}. Строгих ограничений на вид катионов не существует, поэтому поток каждого из них через канал определяется главным образом их концентрациями и электрохимическими движущими силами. Так как градиент напряжения уравновешивает градиент концентрации K^+ через мембрану при наличии потенциала покоя, то и движущая сила для ионов K^+ близка к нулю (см. схему 6-2). Напротив, для ионов Na^+ как градиент напряжения, так и градиент концентрации действуют в одном направлении, способствуя движению ионов внутрь клетки. Это же справедливо и для Ca^{2+} , но его внеклеточная концентрация намного меньше концентрации ионов натрия, и, следовательно, вклад Ca^{2+} в общий ток ионов незначителен. Поэтому открывание ацетилхолиновых рецепторных каналов приводит к большому притоку ионов Na^{2+} (максимальная скорость притока составляет около 30 000 ионов на 1 канал за 1 миллисекунду). Этот ток вызывает деполяризацию мембраны, что служит сигналом для мышечного сокращения, как описано ниже.

Ранее были определены также последовательности нуклеотидов

ДНК, кодирующие субъединицы нескольких разны трансмиттер-зависимых ионных каналов. Выведенные из них аминокислотные последовательности гомологичны друг другу и соответствующим субъединицам ацетилхолинового рецептора, что говорит об эволюционном родстве этих ионных каналов.

6.4.19. Нервно-мышечная передача включает в себя последовательную активацию по крайней мере четырех различных наборов воротных каналов [36]

Исключительную роль ионных каналов, имеющих «ворота» (или воротных каналов) для работы электрически возбудимых клеток, можно проиллюстрировать на примере стимуляции мышечной клетки к сокращению приходящим нервным импульсом. Этот с виду простой ответ состоит из последовательного открывания и закрывания по крайней мере четырех различных наборов каналов, имеющих ворота, и все это происходит менее чем за 1 секунду (рис. 6-65).

1. Процесс начинается, когда нервный импульс достигает нервного окончания и деполяризует его плазматическую мембрану. Деполяризация открывает на время потенциал-зависимые воротные Ca^{2+}-каналы в этой мембране. Поскольку концентрация Ca^{2+} снаружи клетки более чем в 1000 раз превышает концентрацию свободного Ca^{2+} в клетке, ионы кальция устремляются внутрь нервного окончания. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле нервного окончания стимулирует локальное высвобождение ацетилхолина в синаптическую щель.

2. Высвобожденный ацетилхолин связывается с ацетилхолиновыми рецепторами на плазматической мембране постсинаптической мышечной клетки. Это вызывает временное открывание катионных каналов рецепторов. В результате приток Na^{+} приводит к локальной деполяризации мембраны мышечной клетки.

3. Деполяризация плазматической мембраны мышечной клетки открывает ворота потенциал-зависимых Na^{+}-каналов этой мембраны, способствуя засасыванию еще большего количества ионов Na^{+} . Таким образом происходит усиление деполяризации мембраны. Это в свою очередь приводит к тому, что открываются следующие потенциал-зависимые Na^{+}-каналы и в конце концов возникает волна деполяризации (потенциал действия), которая распространяется до тех пор, пока не охватит всю мышечную мембрану.

4. Общая деполяризация плазматической мембраны мышечной клет-

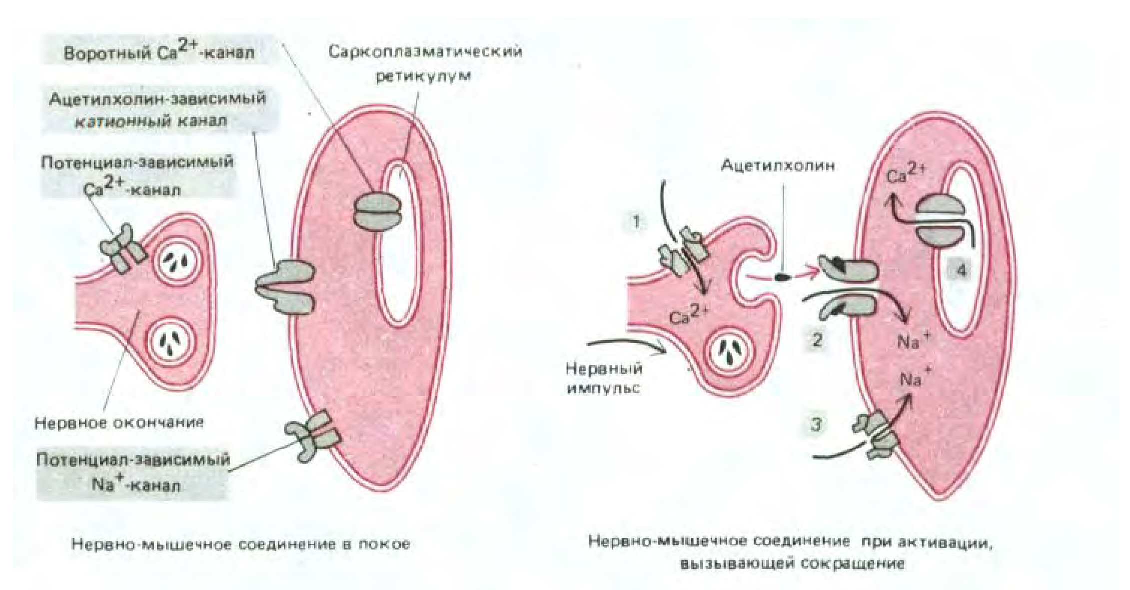


Рис. 6-65. Схема нервно-мышечного соединения, показывающая, как некоторые имеющие ворота каналы участвуют в стимуляции мышечного сокращения нервным импульсом. Каналы пронумерованы в той последовательности, в которой они открываются (см. текст). Механизм открывания Ca^{2+}-каналов в саркоплазматическом ретикулуме неизвестен.

ки приводит к временному открытию Ca^{2+}-каналов в мембранах саркоплазматического ретикулума и высвобождению Ca^{2+} в цитозоль. В результате происходит повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, вызывающее сокращение миофибрилл в мышечной клетке (см. разд. 11.1.11). Пока неизвестно, каким образом изменения напряжения на мышечной плазматической мембране служат сигналом для открывания потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов в мембране саркоплазматического ретикулума. Другая возможность связана с тем, что деполяризация мышечной плазматической мембраны активирует медиаторные пути передачи сигнала с помощью инозитолфосфолипида, что обсуждается в гл. 12.

6.4.20. Ионофоры повышают ионную проницаемость мембран [37]

Ионофоры - это небольшие гидрофобные молекулы, которые растворяются в липидных бислоях и повышают их проницаемость для ионов. Большинство ионофоров синтезируется микроорганизмами (вероятно, в качестве оружия против своих конкурентов), некоторые из них используются как антибиотики. Ионофоры широко применяются в клеточной биологии для повышения проницаемости мембран по отношению к определенным ионам в исследованиях на синтетических бислоях, клетках и клеточных органеллах. Существуют два класса **ионофоров - подвижные переносчики ионов и каналообразующие ионофоры** (рис. 6-66). Ионофоры обоих типов действуют, экранируя заряд транспортируемого иона так, чтобы последний мог пройти гидрофобную внутреннюю область липидного бислоя. Поскольку ионофоры не связаны ни с какими источниками энергии, они лишь позволяют ионам двигаться по их электрохимическим градиентам.

Примером подвижного переносчика ионов может служить *валиномицин.* Он представляет собой полимер, повышающий проницаемость мембраны для ионов K^+ . Валиномицин имеет кольцеобразную структуру. Наружная гидрофобная часть его молекулы состоит из боковых цепей валина и контактирует с углеводородной сердцевиной липидного бислоя. Во внутренней полярной области как раз может поместиться один ион калия (рис. 6-67). Валиномицин переносит K^+ по его электрохимическому градиенту, он захватывает этот ион с одной стороны мембраны, диффундирует с ним через бислой и высвобождает его на другой стороне.

Еще один пример подвижного переносчика ионов-ионофор А23187, который транспортирует двухвалентные катионы, такие, как Ca^{2+} и Mg^{2+} . Этот ионофор обычно действует как ионообменный «челнок»: на каждый двухвалентный катион, вносимый им в клетку, он удаляет два иона H^+ из клетки. Если клетки подвергнуть действию ионофора А23187, ионы Ca^{2+} устремляются в цитозоль по крутому электрохимическому градиенту. Поэтому ионофор А23187 широко используют в клеточной биологии для повышения концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле, моделируя, таким образом, определенные медиаторные механизмы передачи сигнала в клетке (см. разд. 12.3.10).

Если температура мембраны опускается ниже точки ее замерзания, подвижные переносчики уже не могут диффундировать через липидный бислой, и ионный транспорт прекращается. Наличие такой температурной зависимости свидетельствует о том, что данный ионофор - это подвижный переносчик. Если же транспорт ионов продолжается даже в замороженном бислое, можно сделать вывод, что его осуществляет каналообразующий ионофор.

Примером ионофора такого типа является *грамицидин А.* Он представляет собой линейный полипептид, состоящий из 15 аминокислотных

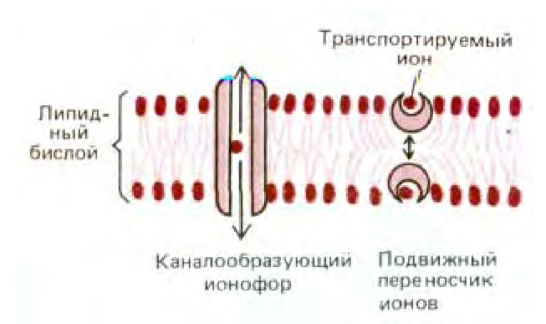


Рис. 6-66. Подвижный переносчик ионов и каналообразующий ионофор. В обоих случаях поток ионов проходит через мембрану только по электрохимическому градиенту.

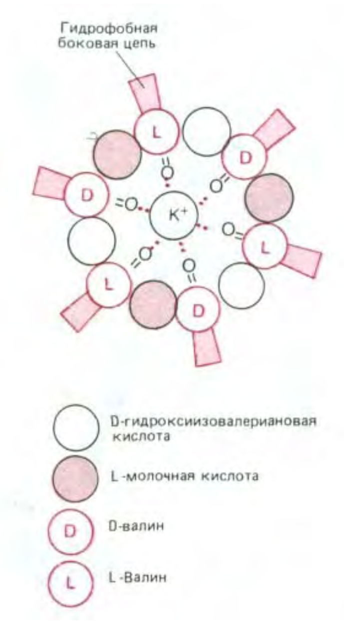


Рис. 6-67. Молекула валиномицина, связанная с расположенным в центре кольцевой структуры ионом K^+ при помощи шести атомов кислорода.

остатков, все они имеют гидрофобные боковые цепи. Две молекулы грамицидина, вероятно, объединяются в бислое и формируют трансмембранный канал, позволяющий моновалентным катионам (H^+ наиболее легко, K^+ менее, а Na^+ с трудом) перетекать по их электрохимических градиентам. Подобные димеры нестабильны: они постоянно образуются и диссоциируют, так что время, в течение которого канал открыт, составляет в среднем 1 с. При наличии большого электрохимического градиента грамицидин А поможет пропустить около 20 000 катионов в расчете на один открытый канал за 1 миллисекунду, что в 1000 раз больше, чем может перенести за то же время одна молекула подвижного переносчика. Грамицидин - это антибиотик, вырабатываемый определенными штаммами бактерий для уничтожения других микроорганизмов. Его антибактериальное действие основано на том, что он нарушает нормальные градиенты концентраций H^+ , Na^+ и K^+ , чрезвычайно важные для жизнедеятельности клеток.

Заключение

Липидные бислои в значительной степени не проницаемы для большинства полярных молекул. Для транспортировки малых водорастворимых молекул в клетку или из клетки в плазматических мембранах содержится большое число различных транспортных белков, каждый из которых ответствен за перенос определенного вещества через мембрану. Существуют два класса мембранных транспортных белков - переносчики и каналы. И те и другие формируют сквозные транспортные пути через липидный бислой.

Белки-переносчики связывают специфические вещества и переносят их через бислой, подвергаясь ряду конформационных изменений, позволяющих экспонировать связывающие вещество участки последовательно: сначала с одной стороны мембраны, а затем с другой. Некоторые белки-переносчики транспортируют вещества только «с горки», другие же, испытывая ряд конформационных изменений, вызываемых гидролизом АТР или связыванием ионов, способны работать как насосы, активно качая связывающееся с ними растворенное вещество «в горку» против его электрохимического градиента.

Белки-каналы образуют в бислое заполненные водой поры, позволяя, таким образом, неорганическим ионам подходящего размера и заряда перемещаться через мембрану по их электрохимическим градиентам. Скорость прохождения в этом случае по крайней мере в 1000 раз выше, чем при транспорте с помощью белков-переносчиков. Эти ионные каналы имеют «ворота» и обычно открываются на короткое время в ответ на специфические возбуждения в мембране, такие, как связывание нейротрансмиттеров (нейротрансмиттер-зависимые воротные каналы) или изменение мембранного потенциала (потенциал-зависимые воротные каналы) .

6.5. Перенос через мембрану макромолекул и частиц: экзоцитоз и эндоцитоз

Транспортные белки опосредуют проникновение через клеточные мембраны многих полярных молекул небольшого размера, однако они не способны транспортировать макромолекулы, например белки, полинуклеотиды или полисахариды. Тем не менее в большинстве клеток макромолекулы могут как поглощаться, так и секретироваться, а некоторые специализированные клетки способны захватывать даже крупные частицы. Механизмы, с помощью которых клетки осуществляют эти процессы, сильно отличаются от механизмов, опосредующих транспорт

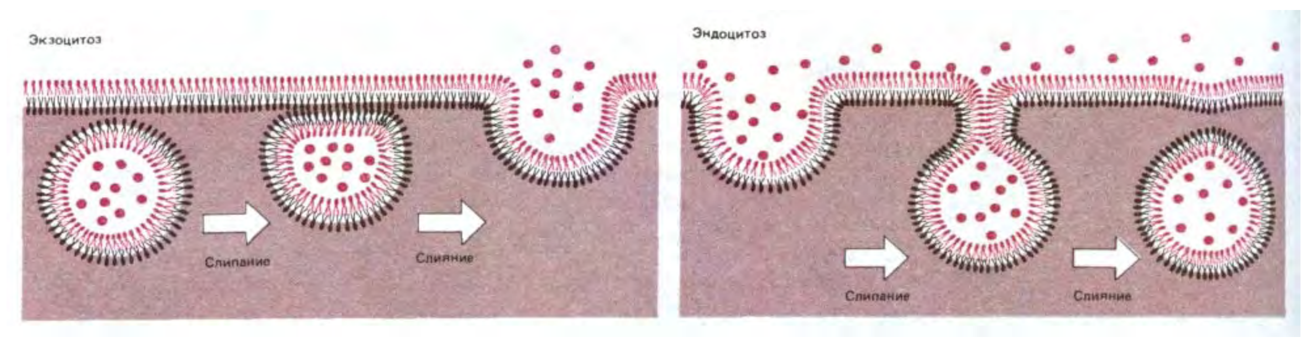


Рис. 6-68. Слипание и объединение бислоев при экзоцитозе и эндоцитозе. Внеклеточное пространство находится сверху; оно отделено от цитоплазмы *(снизу)* плазматической мембраной. Обратите внимание, что из-за наличия стадии слипания бислоев экзоцитоз и эндоцитоз не повторяют друг друга в обратном порядке: при экзоцитозе слипаются два монослоя плазматической мембраны, обращенные к цитоплазме, тогда как при эндоцитозе два наружных монослоя мембраны. В обоих случаях сохраняется асимметрический характер мембран и монослой, обращенный к цитоплазме, всегда контактирует с цитозолем.

небольших молекул и ионов. При переносе макромолекул происходит последовательное образование и слияние окруженных мембраной пузырьков (везикул). Например, для того чтобы секретировать инсулин, клетки, продуцирующие этот гормон, упаковывают его в специализированные *секреторные пузырьки.* В ответ на внеклеточные сигналы эти пузырьки сливаются с плазматической мембраной и открываются во внеклеточное пространство, высвобождая при этом инсулин. Подобный процесс слияния называется **экзоцитозом.** Клетки способны также поглощать макромолекулы и частицы, используя сходный механизм, только в обратной последовательности. Поглощенное вещество постепенно окружается небольшим участком плазматической мембраны, который сначала впячивается, а затем отщепляется, образуя внутриклеточный пузырек, содержащий захваченный клеткой материал. Этот процесс называется **эндоцитозом.** Процессы экзоцитоза и эндоцитоза представлены для сравнения на рис. 6-68. Оба механизма включают слияние первоначально разделенных участков липидного бислоя и осуществляются по крайней мере в две стадии: на первой два бислоя склеиваются *(слипание бислоев),* а затем сливаются *(слияние бислоев).* Обе стадии, по-видимому, опосредуются специализированными белками, что будет обсуждаться ниже (см. разд. 6.5.16).

Важная особенность как экзоцитоза, так и эндоцитоза заключается в том, что секретируемые или поглощаемые макромолекулы локализуются в пузырьках и обычно не смешиваются с другими макромолекулами или органеллами клетки. Пузырьки могут сливаться только со специфическими мембранами, что обеспечивает направленный перенос макромолекул между внеклеточным пространством и содержимым клетки. Аналогичный процесс осуществляется во время переноса новосинтезированных макромолекул из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи и затем к другим компартментам клетки (см. гл. 8). Хотя ясно, что быстрое и повсеместное образование и слияние пузырьков - это фундаментальная особенность всех эукариотических клеток, молекулярные механизмы, обеспечивающие приведение в действие и направление этого транспорта по специфическим путям, во многом еще требуют изучения.

6.5.1. Существуют два пути экзоцитоза - конститутивный и регулируемый [38]

Во всех эукариотических клетках транспортные пузырьки непрерывно переносят новые компоненты плазматической мембраны из аппарата Гольджи к плазматической мембране посредством экзоцитоза. В то же время клетки секретируют различные типы молекул с помощью процесса экзоцитоза. Некоторые из этих молекул могут оставаться на поверхности клетки и становятся частью клеточной мембраны, другие выходят во внеклеточный матрикс. При этом часть из них диффундирует во

внутритканевую жидкость и/или в кровь для питания или переноса сигнала к другим клеткам.

Как описано в гл. 8, секретируемые белки синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР). Эти белки проходят в полость ЭР и транспортируются к аппарату Гольджи с помощью отпочковавшихся от ЭР *транспортных пузырьков.* В аппарате Гольджи белки модифицируются, концентрируются, сортируются и затем упаковываются в пузырьки, которые отщепляются в цитозоль и в конце концов сливаются с мембраной. В отличие от макромолекул секретируемые молекулы малых размеров, например гистамин (см. ниже), активно транспортируются из цитозоля в уже сформировавшиеся пузырьки, где они зачастую связываются со специфическими макромолекулами (в случае гистамина - с протеогликанами) и в результате могут накапливаться в высокой концентрации, не создавая при этом чрезмерного осмотического градиента.

Некоторые белки непрерывно секретируются производящими их клетками. При этом они упаковываются в транспортные пузырьки в аппарате Гольджи и затем переносятся непосредственно к плазматической мембране. В этом случае говорят о *конститутивном пути секреции.* В других клетках определенные белки и/или малые молекулы запасаются в специальных **секреторных пузырьках,** которые сливаются с плазматической мембраной только после получения клетки соответствующего сигнала извне. Этот процесс носит название *регулируемого пути секреции* (рис. 6-69). Конститутивный путь осуществляется во всех клетках, а регулируемый путь обнаружен главным образом в клетках, приспособленных для секреции производимых ими веществ в зависимости от определенных потребностей. Обычно это гормоны, нейротрансмиттеры или переваривающие ферменты. В таких специализированных *секреторных клетках* сигналом к секреции часто служит химический медиатор, например, гормон, связывающийся с рецепторами на клеточной поверхности. В результате происходит активация рецепторов, которая генерирует внутриклеточный сигнал, зачастую включающий кратковременное повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле (см. разд. 12.3.7). С помощью неизвестного механизма этот сигнал (сигналы) инициирует процесс экзоцитоза, побуждая секреторные пузырьки к слиянию с плазматической мембраной и, таким образом, к высвобождению их содержимого во внеклеточное пространство.

В процессе экзоцитоза мембраны пузырьков объединяются с плазма-

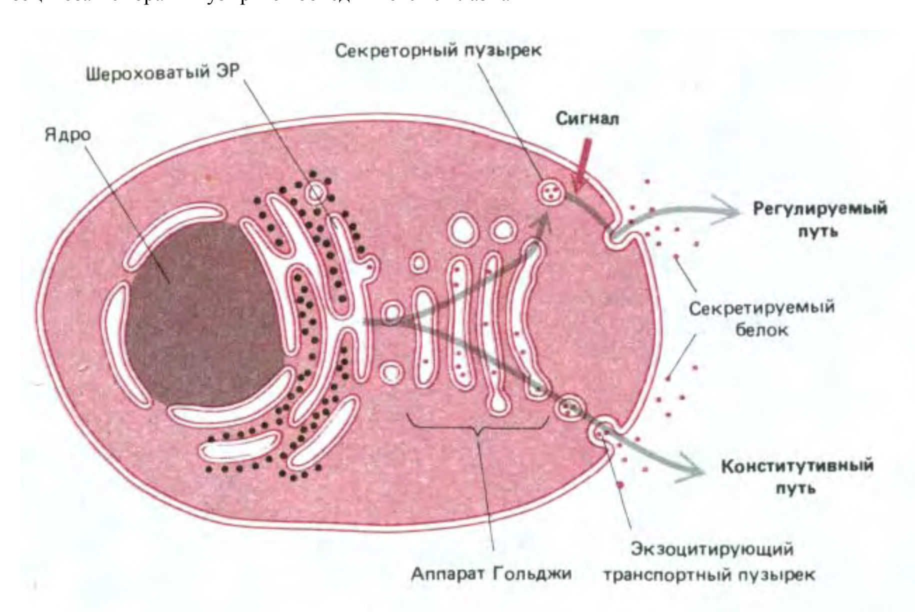


Рис. 6-69. Два пути прохождения секретируемых белков. Некоторые секретируемые белки упаковываются в транспортные пузырьки и непрерывно секретируются *(конститутивный путь).* Другие содержатся в специальных секреторных везикулах и высвобождаются только в ответ на стимуляцию клетки внеклеточными сигналами *(регулируемый путь).* Конститутивный путь осуществляется во всех эукариотических клетках, тогда как регулируемый путь - только в клетках специализированных для секреции (секреторных клетках).

тической мембраной (см. рис. 6-68). По крайней мере в случае регулируемого пути белки и липидные компоненты секреторных мембран возвращаются позднее специфическим образом в первоначальное состояние посредством экзоцитоза, для того чтобы войти в состав новых секреторных пузырьков. Общая площадь мембраны секреторных пузырьков, временно включающейся в состав плазматической мембраны, может быть огромна: в ацинарной клетке поджелудочной железы, выделяющей пищеварительные ферменты, в состав апикальной плазматической мембраны (площадь которой составляет лишь 30 мкм^2) при стимулировании клетки к секреции включается до 900 мкм^2 везикулярной мембраны.

6.5.2. Регулируемый экзоцитоз - это локальный ответ плазматической мембраны и находящейся под ней цитоплазмы [39]

Тучные клетки секретируют **гистамин** (см. табл. 12-1) в ответ на связывание специфических лигандов с рецепторами на их поверхности. Именно гистамин, секретируемый тучными клетками ответствен за многие неприятные симптомы, такие, как зуд или чихание, сопровождающие аллергические реакции. Если тучные клетки проинкубировать в среде, содержащей растворимый стимулятор, то экзоцитоз наблюдается по всей клеточной поверхности (рис. 6-70). Если же стимулирующий лиганд искусственно связан с твердой гранулой, так что он может взаимодействовать только с небольшим участком поверхности тучной клетки, экзоцитоз ограничивается местом контакта с гранулой (рис. 6-71). Ясно, что тучная клетка не отвечает на стимуляцию как нечто целое: активация рецепторов, внутриклеточные сигналы как результат этой активации и последующий экзоцитоз, очевидно, происходят лишь в том участке клетки, который подвергается стимуляции. Это свидетельствует о важном свойстве плазматической мембраны: отдельные ее участки могут функционировать независимо от остальной мембраны. Как мы видим, это свойство одинаково важно как для экзоцитоза, так и для эндоцитоза.

6.5.3. Существуют два вида эндоцитоза: пиноцитоз и фагоцитоз [40]

В зависимости от размера образующихся пузырьков различают два типа эндоцитоза: **пиноцитоз** (от греч. pino - пью + kitos - клетка), предполагающий поглощение жидкости и растворенных веществ с помощью небольших пузырьков (150 нм в диаметре), и **фагоцитоз** (от греч. phagos - пожирающий + kitos - клетка), означающий поглощение больших частиц, таких, как микроорганизмы или обломки клеток. В этом случае образуются крупные пузырьки, называемые *фагосомами,* или *вакуолями* (с диаметром, как правило, > 250 нм).

Жидкость и растворенные вещества непрерывно поглощаются большинством эукариотических клеток посредством пиноцитоза, тогда как большие частицы захватываются в основном специализированными клетками - фагоцитами. По этой причине для большинства клеток термины «пиноцитоз» и «эндоцитоз» обычно употребляются в одном и том же смысле.

Большинство частиц и молекул, поглощенных клеткой посредством фагоцитоза или пиноцитоза заканчивают свой путь в *лизосомах.* Большие частицы включаются в фагосомы, которые затем, видимо, сливаются с лизосомами, образуя *фаголизосомы.* Жидкость и макромолекулы, поглощенные при пиноцитозе, первоначально переносятся в проме-

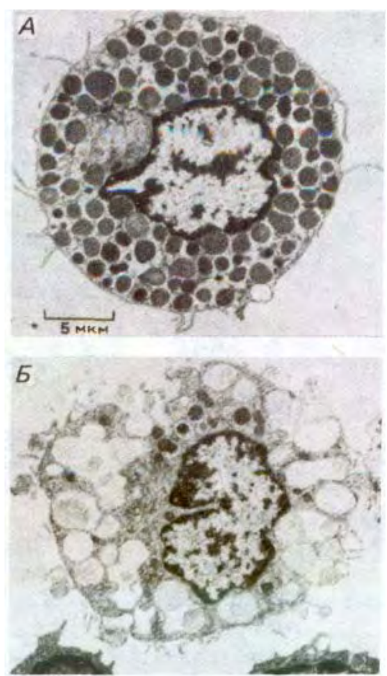


Рис 6-70. Электронные микрофотографии, показывающие экзоцитоз в тучных клетках крысы. *А.* Клетка не подвергалась стимуляции. *Б.* Клетка активировалась внеклеточным лигандом с целью вызвать секрецию запасенного в ней гистамина. Пузырьки, содержащие гистамин, выглядят темными, а пузырьки, освободившиеся от него, - светлыми. То, что остается в пузырьках после секреции гистамина, представляет собой сеть из протеогликанов, с которыми в норме связан запасаемый гистамин. Если секреторный пузырек слился с плазматической мембраной, то его собственная мембрана часто служит после этого мишенью для слияния с другими секреторными пузырьками. Таким образом, множество секреторных пузырьков в тучных клетках открывается во внеклеточное пространство через другие открывшиеся пузырьки. В результате клетка *(Б)* содержит несколько больших полостей, образованных слившимися друг с другом мембранами множества опорожненных пузырьков, составляющих теперь с плазматической мембраной единое целое. Эти полости не всегда оказываются в одной плоскости сечения клетки. (По D. Lawson et al., J. Exp. Med., 142, 391-402, 1975, с разрешения Rockefeller University Press.)



Рис. 6-71. Электронная микрофотография тучной клетки, активированной *с* целью вызвать секрецию гистамина. Активация проводилась с помощью стимулятора, «пришитого» к твердой грануле. Экзоцитоз идет только в той области клетки, которая контактирует с гранулой. (По D. Lawson et al., J. Cell. Biol., 79, 394-400, 1978, с разрешения Rockefeller University Press.)

жуточные мембраносвязанные органеллы, называемые *эндосомами,* откуда они в конце концов либо переходят в лизосомы, либо специфическим образом возвращаются обратно. Поскольку в лизосомах имеются разнообразные гидролитические ферменты (см. разд. 8.8.1), большая часть материала, содержащегося в фагосомах и эндосомах, слившихся с лизосомами, быстро разрушается, низкомолекулярные продукты распада, такие, как аминокислоты, сахара и нуклеотиды, транспортируются через мембрану лизосомы в цитозоль, где они могут быть использованы клеткой. Большинство же мембранных компонентов эндоцитозных пузырьков возвращаются с помощью экзоцитоза из фагосом и эндосом и повторно утилизируются в плазматической мембране.

6.5.4. Пиноцитозные пузырьки образуют окаймленные ямки в плазматической мембране [41]

Практически все эукариотические клетки непрерывно поглощают кусочки своих мембран в виде небольших эндоцитозных (пиноцитозных) пузырьков, которые впоследствии возвращаются на клеточную поверхность. Этот цикл эндоцитоза начинается в специализированных областях плазматической мембраны, называемых **окаймленными ямками.** На обычных электронных микрофотографиях эти области выглядят как впячивания плазматической мембраны, окаймленные щетиноподобной структурой на цитоплазматической стороне. В различных клетках такие структуры занимают около 2% общей площади плазматической мембраны. Время жизни окаймленных ямок невелико: формируются они примерно в течение минуты, затем втягиваются в клетку и, сужаясь у основания, отщепляются, образуя **окаймленные пузырьки** (рис. 6-72). Установлено, что из плазматической мембраны фибробластов, растущих в культуре, в течение каждой минуты отщепляется примерно 2500 окаймленных пузырьков. Время их жизни оказалось даже меньше, чем у окаймленных ямок: они очень быстро теряют свою кайму и после этого могут сливаться с эндосомами. Содержимое этих эндоцитозных пузырьков в конце концов попадает в лизосомы либо возвращается в прежнее состояние.

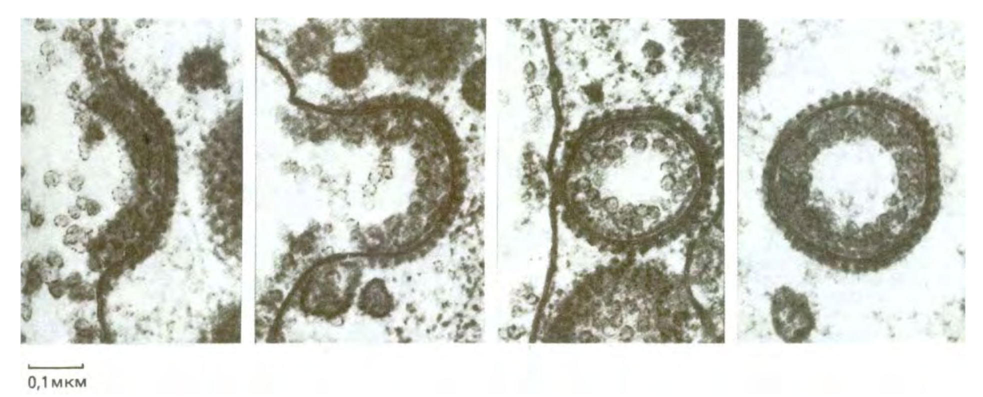


Рис. 6-72. Электронные микрофотографии, иллюстрирующие вероятную последовательность событий при образовании окаймленного пузырька из окаймленной ямки. Показанные здесь окаймленные ямка и пузырьки участвуют в продвижении липопротеиновых частиц внутрь очень большого куриного ооцита при образовании желтка; они здесь несравненно крупнее, чем в клетках обычного размера. (С любезного разрешения M. M. Perry и A. B. Gilbert, J. Cell. Sci., 39, 257-272, 1979.)

6-30

6.5.5. Окаймленные ямки содержат клатрин [42]

На электронных микрофотографиях образцов, полученных методом быстрого замораживания и глубокого травления, поверхность окаймленных ямок и пузырьков имеет вид сетки из многоугольников (рис. 6-73). Из чего же построена кайма и каковы ее функции? После того как окаймлённые пузырьки, образующиеся из окаймленных ямок, были выделены, обнаружилось, что их мембраны содержат несколько «мажорных» белков. Из них лучше всего охарактеризован **клатрин** - белковый комплекс, весьма консервативный в эволюции. Он состоит из трех длинных и трех коротких полипептидных цепей, образующих трехвалентный белковый комплекс *(трискелион)*. Трискелионы формируют на цитоплазматической поверхности мембраны корзиноподобные сетчатые структуры из шестиугольников и пятиугольников (рис. 6-74). Остальные белки, более тесно связанные с мембраной окаймленных пузырьков, необходимы для связывания клатриновой оболочки с пузырьком и для улавливания различных рецепторов плазматической мембраны (см. ниже).

Предполагают, что впячивание окаймленной ямки осуществляется за счет сил, возникающих при ассоциации клатрина с другими белками оболочки, находящимися на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. После формирования окаймленного пузырька клатрин вместе с ассоциированными белками отделяется от мембраны пузырька и возвращается в плазматическую мембрану для образования новых окаймленных ямок. Однако остается неясным, каким образом индуцируется образование окаймленной ямки, как окаймленная ямка превращается в окаймленный пузырек и каким образом происходит отделение этой оболочки от пузырька. Интересно, что один из белков, относящихся к семейству hsp 70 (белков теплового шока), действует in vitro как АТРаза, удаляющая клатриновую оболочку с пузырьков (см. разд. 8.8.6). Видимо, должен существовать некий механизм, контроли-

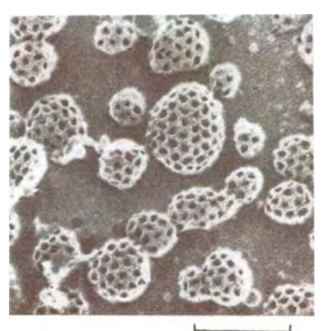


Рис. 6-73. Электронная микрофотография многочисленных окаймленных ямок и пузырьков на внутренней поверхности плазматической мембраны фибробластов в культуре. Клетки были быстро заморожены в жидком гелии, подвергнуты скалыванию и затем глубокому травлению, чтобы сделать видимой цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны. (По J. Heuser, J.Cell. Biol., 84, 560-583, 1980, с разрешения Rockefeller University Press.)

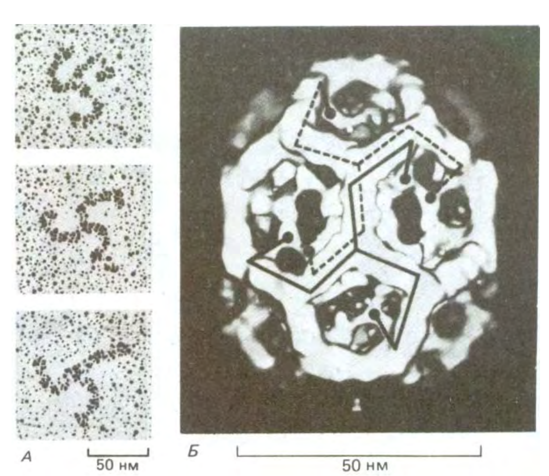


Рис. 6-74. Структура клатриновой оболочки. *А.* Электронные микрофотографии клатриновых трискелеонов, оттененных платиной. Каждый трискелеон состоит из трех тяжелых и трех легких полипептидных цепей клатрина. Естественно, эти детали на микрофотографиях не видны. *Б.* Трехмерная модель клатриновой оболочки. 36 трискелеонов образуют сеть из 12 пятиугольников и 8 шестиугольников. Концы двух трискелеонов отмечены на фотографии. Обратите внимание, что каждая ножка трискелеона проходит вдоль двух соседних граней многоугольника и затем поворачивает внутрь, так что их N-концевые домены *(черные кружки)* образуют внутренний остов оболочки. То, что гибкие концы трискелеонов перекрываются друг с другом, обеспечивает как механическую прочность, так и подвижность всей структуры. Клатриновые оболочки других размеров и форм сконструированы аналогичным образом из 12 пятиугольников и различного числа шестиугольников. *(А* - Ungewickell и D. Branton, Nature, 289, 420-422, 1981; Б - G.P.A. Vigers et al., EMBO J., 5, 2079-2085, 1986.)

рующий преждевременное удаление клатриновой оболочки с окаймленной ямки до ее превращения в пузырек, поскольку оболочка на ямке существует намного дольше.

6.5.6. Существуют по крайней мере два типа окаймленных пузырьков [43]

В большинстве клеток именно окаймленные ямки и пузырьки осуществляют пиноцитозное поглощение внеклеточной жидкости и мембраносвязанных лигандов. Однако известны пути пиноцитоза, использующие и другие типы пузырьков. К сожалению, недостаток знаний о них в настоящее время не позволяет судить о том, насколько они важны. Некоторые эндотелиальные клетки, выстилающие мелкие кровеносные сосуды, видимо, транспортируют вещества из кровяного русла в окружающую внеклеточную жидкость с помощью эндоцитозных пузырьков, не имеющих клатриновой оболочки. Эти пузырьки курсируют по типу челнока от одной поверхности клетки к другой в процессе, называемом *трансцитозом*. Однако в большинстве других клеток, осуществляющих трансцитоз, этот процесс опосредуется окаймленными ямками и пузырьками (см. разд. 6.5.11).

Не все окаймленные пузырьки в клетке образуются из плазматической мембраны. В гл. 8 будет обсуждаться вопрос о том, что многие из пузырьков непрерывно образуются из эндоплазматического ретикулума и в аппарате Гольджи. Они осуществляют крупномасштабный везикулярный транспорт между этими и другими органеллами. Существуют по крайней мере два типа окаймленных пузырьков: 1) пузырьки с клатриновой оболочкой, участвующие как в эндоцитозе, так и в везикулярном транспорте из *транс-сети* Гольджи в эндолизосомы (см. ниже) и секреторные пузырьки (см. разд. 8.9); 2) пузырьки с неклатриновыми оболочками, осуществляющие везикулярный транспорт из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, из одной цистерны аппарата Гольджи в другую и из аппарата Гольджи к плазматической мембране. Молекулы, образующие оболочку на этих пузырьках, пока неохарактеризованы. Окаймленные (клатриновые) пузырьки и ямки могут быть устроены гораздо сложнее, чем неклатриновые, поскольку они способны узнавать специфические макромолекулы для транспортировки их внутрь, тогда как неклатриновые пузырьки этого делать не могут.

6-35

6.5.7. Эндоцитоз, опосредуемый рецепторами, служит концентрирующим приспособлением для поглощения специфических внеклеточных макромолекул

В большинстве животных клеток клатрин-окаймленные ямки и пузырьки обеспечивают эффективный способ поглощения из внеклеточной жидкости специфических макромолекул в процессе, называемом **опосредуемым рецепторами эндоцитозом.** Макромолекулы связываются со своими рецепторами на поверхности клетки, накапливаются в окаймленной ямке и погружаются в клетку в виде макромолекулярных комплексов, заключенных в эндоцитозный пузырек. Поскольку внеклеточная жидкость попадает в окаймленную ямку и включается в окаймленные пузырьки, растворенные в ней вещества также поглощаются, но с намного меньшей скоростью - этот процесс называется жидкофазным эндоцитозом. Опосредуемый рецепторами эндоцитоз обеспечивает механизм селективного концентрирования, который увеличивает эффективность поглощения специфических лигандов более чем в 1000 раз, так что даже

минорные компоненты внеклеточной жидкости могут специфически поглощаться в большом количестве (без поглощения большого объема внеклеточной жидкости).

6-33
6-34

6.5.8. Клетки поглощают холестерол вместе с липопротеинами низкой плотности (ЛНП) путем опосредуемого рецепторами эндоцитоза [44]

Важный процесс, идущий во многих животных клетках при помощи опосредуемого рецепторами эндоцитоза - это поглощение холестерола из внеклеточной среды. За счет этого обеспечивается большая часть потребности клеток в холестероле, необходимом для синтеза новых мембран. Если проникновение холестерола в клетки заблокировать, то холестерол накапливается в крови и может способствовать образованию атеросклеротических бляшек на стенках кровеносных сосудов. Основная часть холестерола переносится кровью в виде комплексов с белком. Эти комплексы называются **липопротеинами низкой плотности,** или **ЛНП,** и представляют собой большие сферические частицы (22 нм в диаметре), каждая из которых имеет сердцевину, заполненную 1500 молекулами холестерола, связанными сложноэфирными связями с длинными цепями жирных кислот. Сердцевина ЛНП окружена липидным монослоем, содержащим единственную молекулу белка, организующую структуру этой частицы (рис. 6-75).

Когда клетке необходим холестерол для синтеза мембраны, она производит белки-рецепторы ЛНП и встраивает их в плазматическую мембрану. Появившись в мембране, рецептор ЛНП диффундирует в ней до тех пор, пока не встретится с формирующейся окаймленной ямкой и не включится в ее состав (рис. 6-76, *А).* Поскольку окаймленные ямки постоянно отщепляются, образуя окаймленные пузырьки, все ЛНП-частицы, связавшиеся с ЛНП-рецепторами в окаймленной ямке быстро проникают внутрь клетки. После потери клатриновых оболочек пузырьки высвобождают свое содержимое в эндосомы. В эндосомах ЛНП-частицы и их рецепторы разделяются: рецепторы возвращаются в дальнейшем обратно в мембрану, а ЛНП доставляются к лизосомам (рис, 6-77). В лизосомах эфиры холестерола, находящиеся в ЛНП-части-



Рис. 6-75. Схематическое изображение липопротеиновой частицы низкой плотности (ЛНП) в поперечном разрезе. Каждая сферическая частица с массой 3 x 10^6 Да содержит около 1500 молекул эфира холестерола, окруженных липидным монослоем, состоящем из ~800 фосфолипидных и 50 холестерольных (не этерифицированных) молекул. Структуру частицы организует одна молекула белка (500000 Да), ответственная за специфическое связывание ЛНП с рецепторным белком клеточной поверхности.

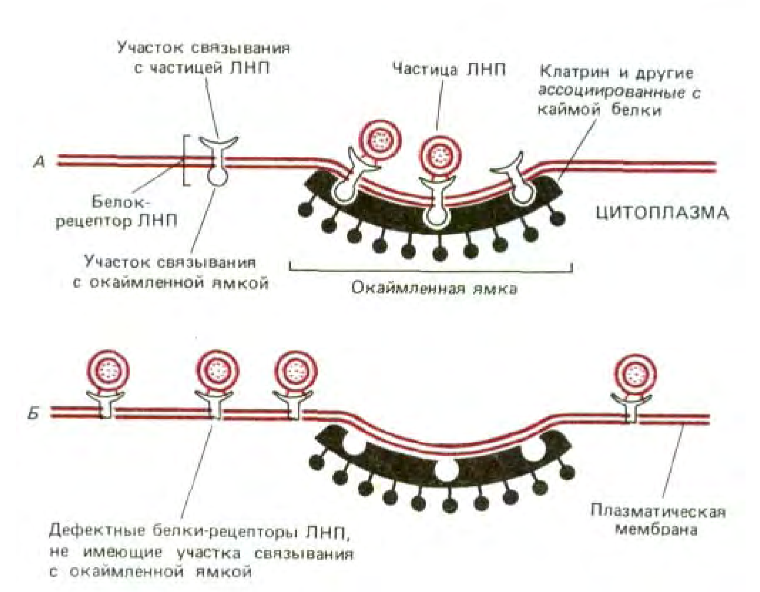


Рис. 6-76. Белки - рецепторы ЛНП связываются с участками окаймленных ямок в плазматической мембране нормальных клеток *(А).* Рецепторы ЛНП человека представляют собой трансмембранные гликопротеины, пересекающие бислой 1 раз. Они состоят из 840 остатков, из которых на цитоплазматической стороне находятся лишь 50. *Б.* Мутантная клетка: белки - рецепторы ЛНП дефектны из-за отсутствия у них участков в цитоплазматическом домене, которые дают им возможность связываться с окаймленными ямками. Такие клетки связывают ЛНП; но не могут поглощать их. У людей примерно один из 500 человек имеет один дефектный ген рецептора ЛНП; для такого человека высок риск смерти в раннем возрасте из-за болезни сердца.

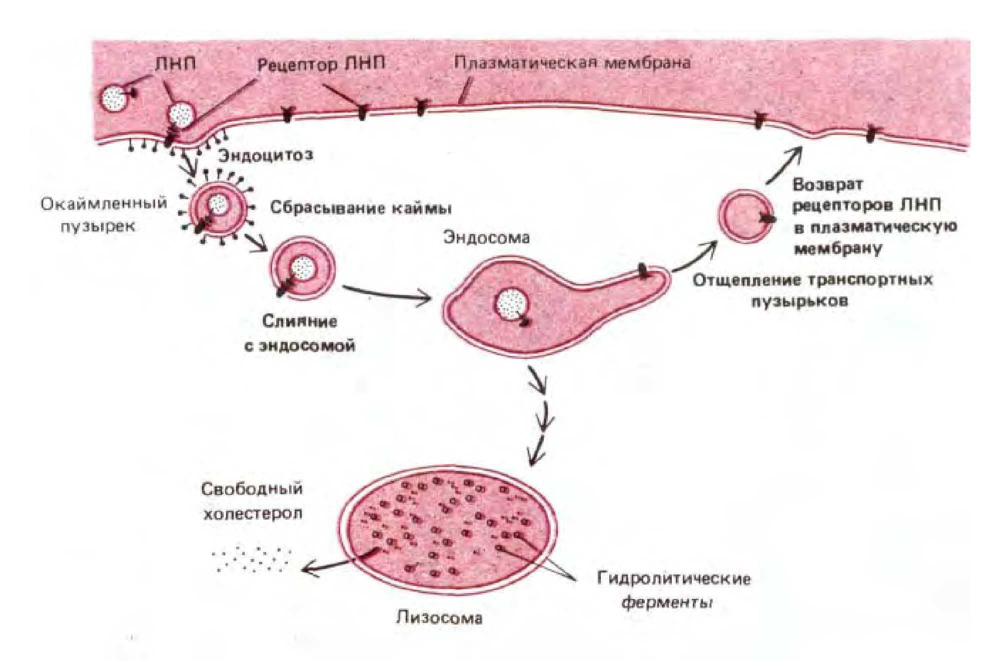


Рис. 6-77. Опосредуемый рецептором эндоцитоз ЛНП. Обратите внимание, что ЛНП диссоциирует от рецептора в кислом окружении в эндосоме. Механизм транспорта не известен. ЛНП попадают в лизосому и деградируют, высвобождая холестерол. ЛНП-рецепторы возвращаются опять в плазматическую мембрану через транспортные пузырьки, которые отщепляются в тубулярной области эндосомы. Для простоты показан только один рецептор ЛНП, проникающий в клетку и возвращаемый в плазматическую мембрану. Независимо от того, связался ли рецептор с ЛНП, он проходит цикл поглощения-возвращения каждые 10 мин, совершая несколько сотен оборотов за время своего существования (около 20 ч).

цах, гидролизуются до свободного холестерола, который затем может использоваться клеткой при синтезе новых мембран. Если в клетке скопилось слишком много холестерола, то его синтез, а также синтез белков-рецепторов ЛНП подавляются, в результате чего холестерола и меньше производится, и меньше поглощается извне.

Этот путь нарушается у некоторых индивидуумов, унаследовавших дефектные гены белков-рецепторов ЛНП: их клетки не способны поглощать ЛНП из крови. Обусловленный этим дефектом высокий уровень холестерола в крови таких индивидуумов создает предрасположение к преждевременному атеросклерозу, так что большинство из них умирает в раннем возрасте от коронарной болезни сердца. Аномалия может также быть связана с утратой рецепторами участка связывания либо с ЛНП, либо с окаймленной ямкой (см. рис. 6-76, *Б).* В последнем случае имеется достаточное число белков-рецепторов ЛНП, но они не собираются в окаймленных участках плазматической мембраны. ЛНП связываются с поверхностью таких мутантных клеток, однако внутрь не проникают. Это прямо доказывает важность окаймленных ямок в опосредуемом рецепторами эндоцитозе холестерола.

Уже обнаружено более 25 различных рецепторов для разных молекул, участвующих в эндоцитозе. Все они, по-видимому, используют тот же путь через окаймленные ямки. Многие из этих рецепторов встраиваются в окаймленные ямки безотносительно того, связаны ли они со специфическими лигандами или нет. Не все белки плазматической мембраны находятся в окаймленных ямках. Это означает, что ямки работают как молекулярные фильтры, собирающие на своей поверхности определенные белки плазматической мембраны и исключающие присутствие других. Электронно-микроскопические исследования клеток, выращенных в среде с различными лигандами (меченными для того, чтобы различать их при электронной микроскопии), показали, что в одной и той же окаймленной ямке содержится множество видов рецепторов. На участке плазматической мембраны окаймленной ямки может собраться, вероятно, около 1000 рецепторов разных видов. Все комплексы рецепторов с лигандами, утилизируемые в процессе эндоцитоза через окаймленные клатриновые пузырьки, очевидно попадают в дальнейшем в одну и ту же эндосому. Однако последующая судьба этих молекул определяется типом рецептора.

6.5.9. Содержимое эндосом попадает в лизосомы, если не возвращается обратно специфическим образом [45]

На электронных микрофотографиях эндосомный компартмент можно сделать легко различимым объектом, если кратковременно проинкубировать клетки в среде с меченым лигандом. Поглощенный лиганд позволяет выявить эндосомный компартмент в виде сложного набора гетерогенных ограниченных мембраной трубочек и пузырьков. Они располагаются от периферии клетки до ее перинуклеарной области, часто обнаруживаются вблизи аппарата Гольджи, но не в нем самом (рис. 6-78). В экспериментах с меченым лигандом наблюдаются два набора эндосом: *периферические эндосомы,* появляющиеся непосредственно вблизи плазматической мембраны через 1 минуту, и *перинуклеарные (внутренние) эндосомы,* появляющиеся через 5-15 мин. Внутреннее содержимое эндосом кислое (pH 5-6) благодаря накачке ионов H^+ из цитозоля внутрь ATP-зависимым H^+-насосом, находящимся в мембране эндосом. Содержимое внутренних эндосом более кислое, чем периферических. Как мы увидим, кислое окружение поглощенных молекул играет исключительную роль в функционировании этих органелл. По-видимому, одна и та же (или несколько сходных) эндосомная H^+-АТРаза закисляет все эндоцитозные и экзоцитозные органеллы, включая фагосомы, лизосомы, отдельные компартменты аппарата Гольджи и многих транспортных или секреторных пузырьков.

Большая часть содержимого перинуклеарных эндосом попадает в лизосомы. Однако многие молекулы избегают этой участи и возвращаются из периферических (и, возможно, перинуклеарных) эндосом в плазматическую мембрану. Это происходит благодаря отщеплению транспортных пузырьков от эндосом. В результате деградации подвергаются лишь те поглощенные молекулы, которые не должны специфическим образом вернуться обратно.

Сейчас известно, что путь от эндосом к лизосомам намного сложнее, чем это казалось раньше. Гидролитические ферменты, предназначенные для лизосом, первоначально поступают из аппарата Гольджи (в транспортных пузырьках) в специальный предлизосомальный компартмент,

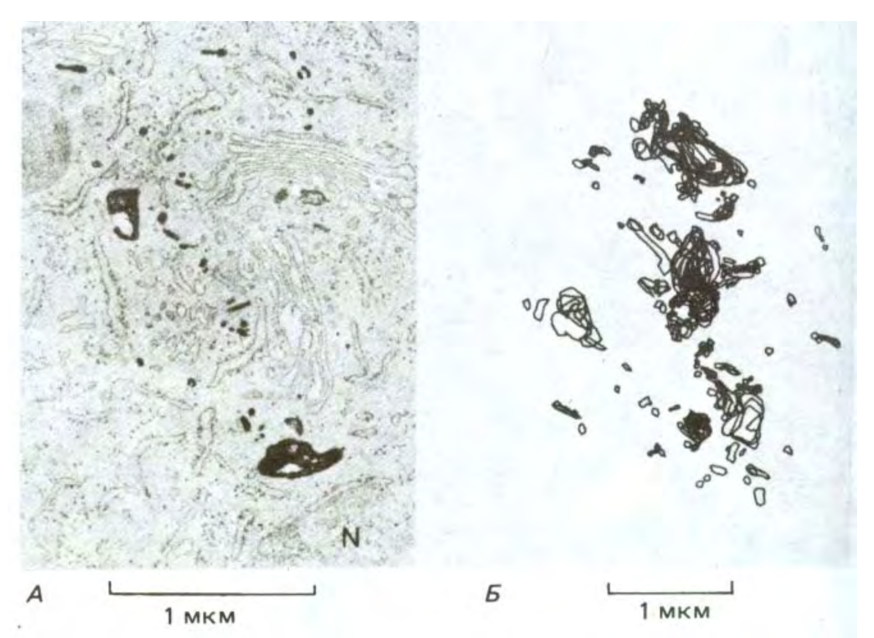


Рис. 6-78. Электронная микрофотография *(А)* и схематическое изображение (*Б*) перинуклеарных эндосом из молодых клеток почек хомячка, растущих в культуре. Клетки инкубировали в среде, содержащей пероксидазу, 15 мин при 37°С, что вполне достаточно для поглощения пероксидазы путем жидкофазного эндоцитоза и переноса в эндосомы (и эндолизосомы, см. текст), но недостаточно для поступления в лизосомы. После фиксации клеток и выдерживания их с субстратом пероксидазы (диаминобензидином) продукты ферментативной реакции фиксировали тетроксидом осмия для увеличения электроноплотности. На (Б) изображена усредненная картина, полученная из 18 тонких срезов. Ядро клетки обозначено буквой N. (A). (Marsh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2899-2903, 1983.)

располагающийся вместе с перинуклеарными эндосомами, но отдельно от них. Хотя эти окруженные мембраной органеллы можно принять за эндосомы, находящиеся на последней стадии созревания, на самом деле процесс гидролитической деградации, который будет завершен в лизосомах, только начинается. Поэтому мы бы назвали эти органеллы *эндолизосомами* (рис. 6-79).

Остается неясным, каким образом поглощенные при эндоцитозе молекулы движутся от одного эндосомного компартмента к другому так, что оказываются в конце концов в лизосомах. Одна из гипотез состоит в том, что периферические эндосомы медленно движутся внутрь клетки, превращаясь в перинуклеарные эндосомы, которые в результате слияния с транспортными пузырьками из аппарата Гольджи, непрерывного возвращения части мембраны обратно и увеличения кислотности превращаются в эндолизосомы, а затем в лизосомы. Другая гипотеза предполагает, что каждый эндосомный и лизосомный компартмент может быть перманентной структурой, наподобие стопки цистерн в аппарате Гольджи (см. разд. 8.7.6). Транспорт же между ними осуществляется через транспортные пузырьки, так же как между соседними цистернами аппарата Гольджи. Мы вернемся к вопросу о том, как формируются лизосомы в гл. 8.

6.5.10. Комплексы лиганд-рецептор сортируются внутри эндосом [46]

Эндосомный компартмент работает как главная сортирующая станция в эндоцитозном пути наподобие аппарата Гольджи, выполняющего такую же функцию в биосинтетическом секреторном пути (см. разд. 8.7.6). Кислая среда внутри эндосом играет ключевую роль в процессе сортировки молекул, оказывая влияние на комплексы рецептора с лигандом и, таким образом, определяя их дальнейшую судьбу. При понижении pH находящиеся в эндосоме рецепторы меняют свою кон-формацию и отделяются от своих лигандов. Освободившиеся внутри эндосомы лиганды, как правило, обречены в дальнейшем на разрушение. Другие лиганды, которые остаются связанными со своими рецепторами, в конечном итоге разделяют судьбу своих рецепторов.

Судьба же специфических рецепторов зависит от их функции: 1) они могут быть возвращены в те же самые области плазматической мембраны, откуда они были поглощены (это наиболее общий для рецепторов путь), 2) могут попасть в лизосомы или 3) могут возвратиться в другую область плазматической мембраны в процессе трансцитоза (рис. 6-80).

Рецептор ЛНП, описанный в разд. 6.5.8, проходит первый путь. Он диссоциирует от своего лиганда (ЛНП) в эндосоме и возвращается в плазматическую мембрану для повторного использования, а освободившиеся ЛНП переносятся в лизосомы (см. рис. 6-77). Сходный, но более сложный цикл имеет место при эндоцитозе **трансферрина -** белка-переносчика железа в крови. Рецептор трансферрина, находящийся на поверхности клетки, переносит трансферрин со связанными ионами железа в периферические эндосомы в процессе эндоцитоза. При низком pH в эндосоме индуцируется отделение железа от трансферрина, но трансферрин (называемый в данном случае апотрансферрином) остается связанным с рецептором и возвращается в плазматическую мембрану в виде комплекса рецептор - апотрансферрин. Попадая во внеклеточную жидкость, имеющую нейтральный pH, апотрансферрин диссоциирует от рецептора и становится способен вновь связывать ионы железа и включаться в новый цикл транспорта. Таким образом, трансферрин курсирует между внеклеточной жидкостью и эндосомным компартментом, не

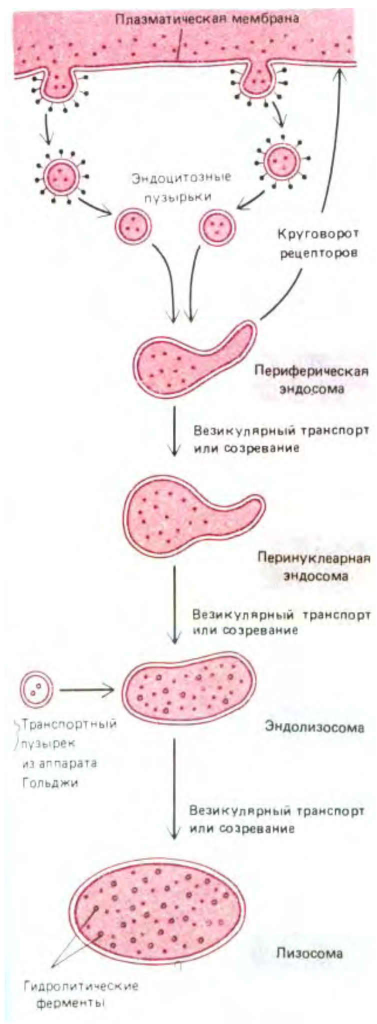


Рис. 6-79. Молекулы, поглощенные в окаймленных ямках, попадают в периферические эндосомы и затем последовательно оказываются в перинуклеарных эндосомах, эндолизосомах и в лизосомах. Однако часть из них может специфически возвращаться обратно из эндосом или эндолизосом. Гидролитические ферменты лизосом первоначально переносятся из аппарата Гольджи в эндосомы. Остается неясным, как поглощенные молекулы, которые не возвращаются обратно, движутся из одного компартмента к другому, оказываясь в конце концов в лизосомах, где они деградируют.

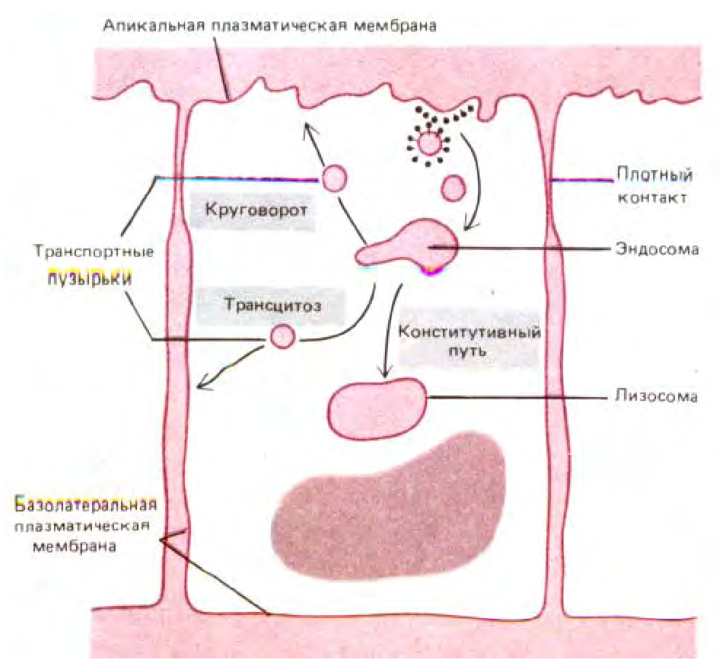


Рис. 6-80. Три пути из эндосомного компартмента в эпителиальных клетках. Большинство молекул, которые не возвращаются обратно из эндосом (или эндолизосом, не показано) в мембрану, идут далее по конститутивному пути из эндосомного компартмента в лизосомы. Возвращенные молекулы попадают либо в ту же область плазматической мембраны, откуда они были поглощены (рециркуляция), либо в другой домен плазматической мембраны (трансцитоз).

попадая в лизосомы и поставляя в клетку необходимое для ее роста железо.

В качестве примера рецептора, проходящего второй путь эндоцитоза, можно привести рецептор, связывающий небольшой *белок - фактор роста эпидермиса (ФРЭ).* Рецепторы ФРЭ несколько необычны, поскольку они накапливаются в окаймленных ямках только после связывания с ФРЭ. По-видимому, необходимы какие-то конформационные изменения рецептора, индуцируемые лигандом, для связывания его в ямках. Более того, ФРЭ диссоциирует из комплекса с рецептором при более низких pH, чем это требуется для диссоциации многих других комплексов лиганд-рецептор. Возможно, по этой причине множество поглощенных рецепторов ФРЭ попадает в лизосомы, где они деградируют вместе с ФРЭ. Таким образом, связывание фактора роста эпидермиса с рецептором приводит к тому, что концентрация рецептора ФРЭ на поверхности клетки уменьшается. В результате этого концентрация сигнального лиганда во внеклеточной жидкости регулирует число комплементарных лиганду рецепторных молекул на поверхности клетки-мишени. Этот механизм регуляции в корне отличается от регуляции ЛНП-рецепторов, число которых зависит от внутриклеточной концентрации холестерола (см. разд. 6.5.8).

6.5.11. Макромолекулы могут переноситься через складки эпителиальных клеток в процессе трансцитоза [47]

Некоторые рецепторы, находящиеся на поверхности поляризованных эпителиальных клеток, переносят специфические макромолекулы из одного внеклеточного пространства в другое в процессе **трансцитоза.** Эти рецепторы проходят в эндосомном компартменте по третьему пути. Например, новорожденные крысы получают антитела из материнского молока (что помогает им защищаться от инфекции), транспортируя их через эпителий кишечника. Среда в полости кишки слегка кислая, при этом низком pH антитела из молока связываются со специфическими рецепторами, находящимися на апикальной (поглощающей) стороне эпителиальных клеток кишечника, и поглощаются через окаймленные пузырьки. Комплексы рецептор - антитело, попав в эндосому, остаются интактными. Затем транспортные пузырьки сливаются с базолатераль-

ным доменом плазматической мембраны. При этом комплексы оказываются на поверхности мембраны в нейтральном pH внеклеточной жидкости. При таком pH антитела диссоциируют из комплекса с рецепторами и в конце концов попадают в кровяное русло новорожденного. В свою очередь у матери секреция антител в молоко также осуществляется путем трансцитоза, но в обратном направлении - из крови в молоко (см. рис. 18-20).

Разнообразие путей, по которым проходят различные рецепторы из эндосом, подразумевает, что многие из них помимо участков связывания лиганда и окаймленной ямки имеют также сигналы для сортировки. Благодаря этим сигналам рецепторы попадают в подходящие транспортные пузырьки, отщепляющиеся от эндосом и в связи с этим оказываются в нужном месте клеточной мембраны. Природа этих сигналов не выяснена. Поскольку гораздо больше известно о похожем процессе, происходящем в аппарате Гольджи, где *транс-сеть* сортирует различные белки в различные транспортные пузырьки, мы отложим дальнейшее обсуждение внутриклеточной сортировки молекул и вернемся к этому вопросу в гл. 8.

6-31
6-32

6.5.12. Окаймленные ямки и пузырьки обеспечивают главный путь жидкофазного эндоцитоза во многих клетках [48]

Скорость поглощения собственной плазматической мембраны путем эндоцитоза можно рассчитать, если во внеклеточную жидкость добавить на короткое время какое-либо вещество, за которым можно следить и измерить скорость его поглощения эндоцитозными пузырьками. Для этого используют два типа таких молекул: либо растворенных во внеклеточной жидкости и поглощаемых *жидкофазным эндоцитозом* (см. рис. 6-78), либо связывающихся с поверхностными рецепторами и поглощаемых в процессе *опосредуемого рецепторами эндоцитоза*. Обычно при любом способе измерения скоростей получают одинаковые результаты. Из этого следует, что путь через окаймленные ямки - окаймленные пузырьки является во многих клетках главным не только для опосредуемого рецепторами эндоцитоза, но и для жидкофазного эндоцитоза.

Скорость поглощения плазматической мембраны зависит от типа клеток, но обычно на удивление велика. Макрофаги, например, каждый час поглощают количество жидкости, равное 25% своего объема. Это означает, что каждую минуту они должны поглощать 3% собственной мембраны, или 100% мембраны примерно за полчаса. Скорость эндоцитоза у фибробластов немного ниже, а у некоторых амеб поглощение мембраны происходит намного быстрее. Поскольку на протяжении всего процесса и площадь клетки, и ее объем остаются неизменными, ясно, что эквивалентное количество мембраны должно появляться на поверхности клетки в процессе экзоцитоза.

6-8

6.5.13. Эндоцитозный цикл может иметь отношение к движению клеток и к феномену «кэппинга» [49]

Окаймленные ямки распределены на поверхности клеток более или менее случайным образом, так что поглощение плазматической мембраны (липиды вместе со специфическими белками-рецепторами) имеет место по всей клеточной поверхности. В неполяризованных клетках поглощенные участки мембраны возвращаются также случайным образом на поверхность клетки. Однако в поляризованных клетках, напри-



Рис. 6-81. Текучесть плазматической мембраны подвижных клеток как результат асимметрии эндоцитозного цикла в этих клетках. Фибробласт (показан в разрезе) движется слева направо. Эндоцитоз мембраны, содержащей рецепторы, происходит в окаймленных ямках, распределенных по клеточной поверхности случайным образом. Поглощенная мембрана возвращается из эндосомного компартмента (не показан) в виде экзоцитозных пузырьков, сливающихся с мембраной передней (по отношению к движению клетки) оконечности клетки. Таким образом, эндоцитоз по всей поверхности и направленный экзоцитоз вызывают перетекание компонентов мембраны в направлении, обратном движению клетки (показано большими цветными стрелками). (По M. S. Bretscher, Science, 224, 681-686, 1984.)

мер фибробластах, ползущих по поверхности субстрата, центросома и ассоциированный с ней аппарат Гольджи смещены в направлении передней части клетки, и поглощенные кусочки мембран возвращаются преимущественно в мембрану переднего края клетки. Такая пространственная асимметрия циклического процесса эндоцитоз - экзоцитоза может помогать клетке выдвигать свой передний край вперед во время движения (см. разд. 11.6.6). Более того, поскольку участки эндоцитоза и экзоцитоза в таких клетках не совпадают, будет существовать постоянный ток липидов и рецепторов по плазматической мембране от переднего края клетки в ее заднюю часть (рис. 6-81). Этот *мембранный поток* может объяснить тот факт, что объекты, типа частичек угля, будучи помещенными на поверхность культуральных фибробластов, перемещаются от передней части клетки к задней при передвижении клетки вперед.

При связывании мультивалентных лигандов (таких, например, как антитела и лектины) со специфическими белками мембраны образуются кластеры, которые, объединяясь между собой, формируют пятна (пэтчи). Этот процесс называется **пэтчингом** (от. англ. patching - ставить заплаты). Такие пятна быстро движутся по поверхности клетки (например, лимфоцита), собираясь в так называемый **«кэп»** или шапочку (рис. 6-82). Процесс образования шапочки, **кэппинг,** занимает всего лишь несколько минут. Он является АТР-зависимым и завершается (в лимфоцитах) появлением этой необычной структуры в задней части клетки. Интересно, что формировать кэп способны лишь клетки, умеющие ползать по поверхности, хотя для этого процесса никакой необходимости в движении клетки нет. Это наводит на мысль, что механизм кэппинга может иметь сходство с механизмами, используемыми клеткой для движения. Одна из гипотез заключается в том, что мембранный поток, описанный выше и возникающий при циклическом эндоцитозе, переносит большие кластеры связанных молекул в задний конец клетки, тогда как свободные (несшитые между собой) белки достаточно быстро диффундируют, и, следовательно, их распределение остается случайным несмотря на поток. Альтернативная гипотеза состоит в том, что кластеры мембранных белков взаимодействуют (прямо или опосредованно) с движущей системой внутри клеточных актиновых филаментов (находящихся в кортексе, непосредственно под плазматической мембраной), которая перемещает кластеры к заднему концу клетки. До сих пор нет четких результатов, исключающих какую-либо из гипотез.

6.5.14. Специализированные клетки - фагоциты поглощают частицы, связывающиеся со специфическими рецепторами на их поверхности [50]

Фагоцитоз - специальная форма эндоцитоза, при которой поглощаются крупные частицы, например, микроорганизмы или клеточный дебрис. Это происходит через образование больших эндоцитозных пузырьков, называемых *фагосомами.* У простейших фагоцитоз - это форма питания: крупные частицы захватываются фагосомами и затем попадают в лизосомы. Продукты переваривания проходят через цитозоль и используются в качестве пищи. В многоклеточных организмах большинство клеток не способны эффективно поглощать крупные частицы. Поэтому

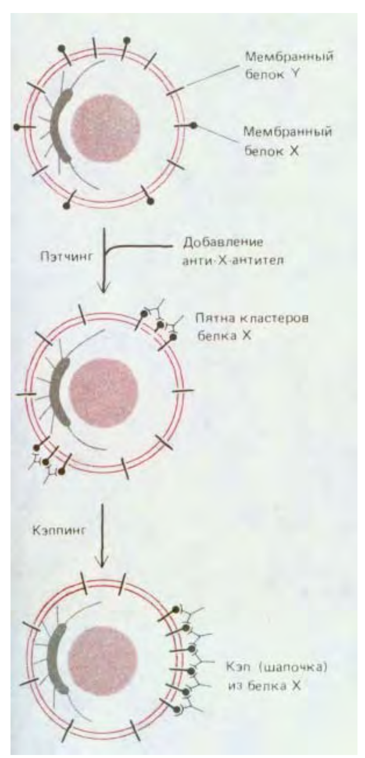


Рис. 6-82. Индуцированный антителами *пэтчинг* и *кэппинг* поверхностных клеточных белков лимфоцитов. Антитела сшивают между собой молекулы белка, с которыми они связаны, образуя крупные кластеры. Кластеры со временем собираются в одном месте, образуя «шапочку» (кэп) на заднем полюсе клетки. Обратите внимание, что передний полюс определяется положением центросомы, а сшитые между собой белки образуют «шапочку» на противоположном полюсе, даже если клетки находятся в суспензии и не мигрируют.

в кишечнике крупные частицы пищи разрушаются вне клеток перед всасыванием, а вообще в организме фагоцитоз осуществляют «профессиональные» фагоциты. У млекопитающих существуют два класса лейкоцитов, опосредующих фагоцитоз: **макрофаги** (широко распространенные как в тканях, так и в крови) и **нейтрофилы.** Эти два типа клеток происходят от общей клетки-предшественника (см. разд. 17.5.8) и защищают нас от инфекции, поглощая вторгшиеся микроорганизмы. Макрофаги играют важную роль также и в утилизации старых или поврежденных клеток и клеточных обломков. В количественном отношении последняя функция особенно важна: в каждом из нас макрофаги ежедневно поглощают посредством фагоцитоза более чем 10^{11} старых эритроцитов.

Эндоцитозные пузырьки, образующиеся из окаймленных ямок, имеют относительно небольшие размеры (~ 150 нм в диаметре). **Фагосомы** же имеют диаметр, который определяется размерами поглощаемой частицы. Иногда они почти такого же размера, как и сами фагоцитирующие клетки (рис. 6-83). Фагосомы сливаются с лизосомами и образуют *фаголизосомы.* Здесь происходит деградация поглощенного материала. Неперевариваемые продукты остаются в фаголизосомах, образуя *остаточные тельца.* Часть поглощенных компонентов собственной плазматической мембраны, как и при эндоцитозе возвращается обратно в плазматическую мембрану. В некоторых макрофагах пептиды, получившиеся при деградации поглощенных белков, возвращаются на клеточную поверхность связанными с гликопротеинами главного комплекса гистосовместимости (см. разд. 18.6.10). Поверхность этих макрофагов затем тщательно обследуется Т-лимфоцитами иммунной системы. Если пептиды происходят от чужеродного агента - они активируют Т-лимфоциты к иммунному ответу. Таким образом, макрофаги в данном случае выступают как клетки, представляющие антиген (см. разд. 18.6.10).

Для того чтобы фагоцитоз имел место, поглощаемые частицы должны прежде всего связаться с поверхностью фагоцита. Однако не все связавшиеся частицы поглощаются. Существует набор специализированных поверхностных рецепторов, функционально связанных с фагоцитозным аппаратом клетки. В отличие от пиноцитоза, конститутивного процесса, протекающего непрерывно, фагоцитоз - явление индуцируемое, в котором активированные рецепторы передают сигналы внутрь клеток для инициации ответа. Наилучшим образом охарактеризованы в качестве таких индукторов, запускающих фагоцитоз, антитела. Антитела защищают нас от инфекции микроорганизмов, связываясь с их поверхностью и образуя оболочку, в которой F_c-области каждой молекулы антитела экспонированы наружу. Эта оболочка затем узнается специфическими F_c-рецепторами, расположенными на поверхности макрофагов и нейтрофилов. Связывание частиц, имеющих оболочку из антител, с этими рецепторами вызывает образование в плазматической мембране клетки псевдоподий, которые обволакивают частицу и сливаются по краям, образуя фагосомы (рис. 6-84).

О двух других классах рецепторов известно лишь, что они способствуют фагоцитозу. Рецепторы одного из этих классов узнают компоненты комплемента, а другого - олигосахариды на поверхности определен-



Рис. 6-83. Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа фотография мышиного макрофага, поглощающего посредством фагоцитоза два химически поврежденных эритроцита. Стрелки указывают на края клетки, участвующие в этом тонком процессе (псевдоподии), когда макрофаг как бы натягивается на эритроцит, поглощая его. (С любезного разрешения Jean Paul Revel.)

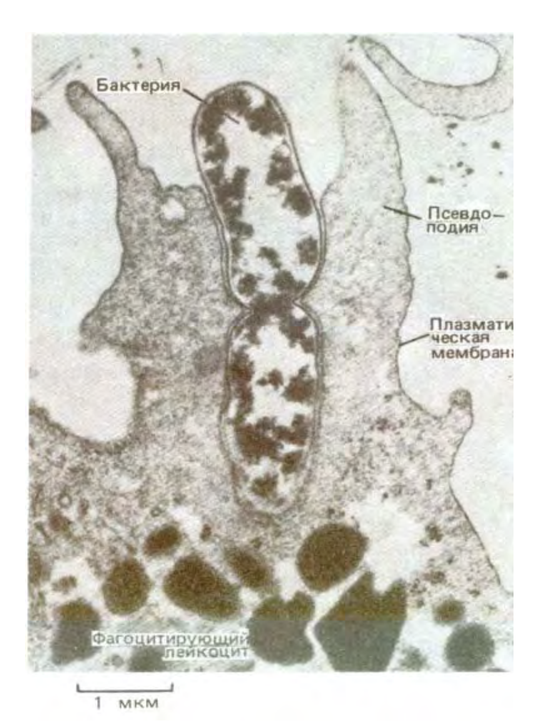


Рис. 6-84. Электронная микрофотография нейтрофила, поглощающего посредством фагоцитоза бактерию, которая находится в процессе деления. (С любезного разрешения Dorothy F. Bainton.)

ных микроорганизмов. К тому же макрофаги могут узнавать и поглощать старые и разрушенные клетки, но о рецепторах, участвующих в этих процессах, практически ничего неизвестно.

6.5.15. Фагоцитоз - это локальная ответная реакция, осуществляющаяся путем «застегивания» мембраны по принципу застежки-молнии [51]

Эритроциты можно обработать таким образом, что они будут связываться на поверхности макрофагов, но не подвергнутся фагоцитозу. Если адсорбировавшим их макрофагам предоставить затем возможность осуществить фагоцитоз бактерий, окруженных антителами, то будут поглощаться лишь бактерии, а эритроциты, даже расположенные в непосредственной близости от места активного фагоцитоза, не будут захватываться. Это говорит о том, что фагоцитоз, как и индуцируемый экзоцитоз тучных клеток (см. разд. 6.5.2), представляет собой локальную ответную реакцию участка плазматической мембраны и лежащих под ней цитоплазматических структур.

Если макрофаг связывается с клетками-мишенями, равномерно покрытыми антителами, он поглощает такие клетки. Однако если молекулы антител сосредоточены в результате кэппинга на одном полюсе клетки (см. разд. 6.5.13), то плазматическая мембрана макрофага сближается с поверхностью клетки-мишени только на участке кэпа, и фагоцитоз не происходит (рис. 6-85). Отсюда следует, что первоначального взаимодействия покрытых антителами клеток с F_c-рецепторами, расположенными на поверхности макрофага, недостаточно для того, чтобы вызвать поглощение этих клеток. Связывание клетки-мишени с макрофагом лишь индуцирует постепенно распространяющийся процесс соединения мембран, для осуществления которого требуется непре-

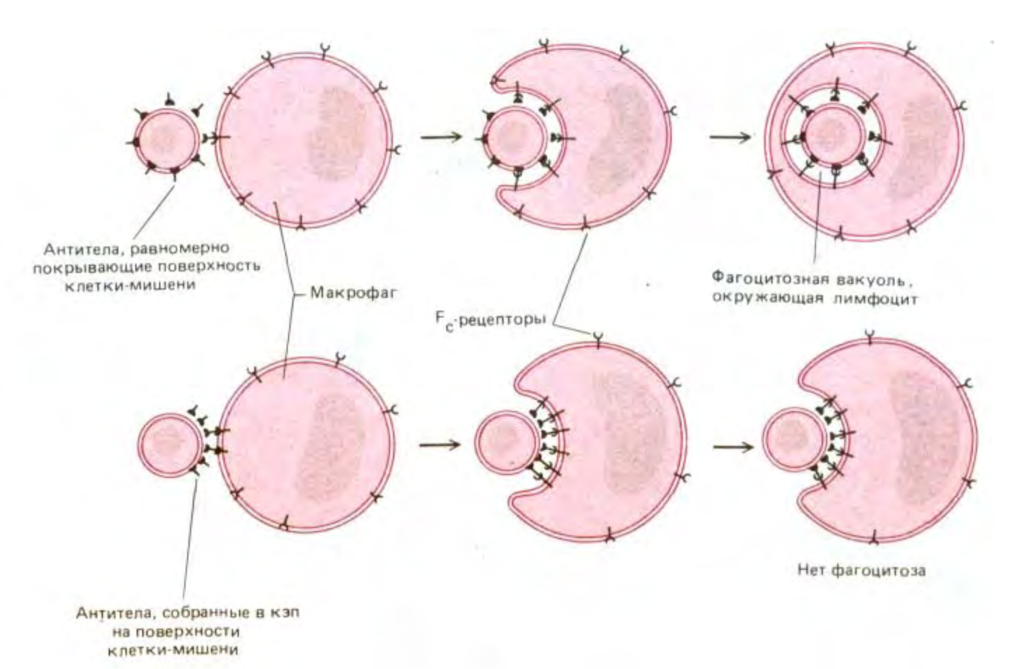


Рис. 6-85. Схема эксперимента, свидетельствующего о том, что фагоцитоз осуществляется путем «застегивания» мембран по принципу застежки-молнии. (По E. M. Griffin et al., J. Exp. Med., 144, 788-809, 1976.)

рывный контакт рецепторов с антителами: только при этом условии поглощаемая клетка оказывается полностью окруженной фагосомой. Это свидетельствует о том, что фагоцитоз происходит путем «застегивания» мембраны с помощью механизма, действующего наподобие застежки-молнии.

Ни механизм инициации поглощения при связывании антител с F_c-рецепторами, ни природа движущих сил, увеличивающих размеры псевдоподий, неизвестны. Однако псевдоподии накапливают актин и актин-связывающие белки, а цитохолазин (препарат, препятствующий полимеризации актина) ингибирует фагоцитоз. Это наводит на мысль об актин-зависимости механизма увеличения размеров псевдоподий. Поскольку на цитоплазматической поверхности фагосом, образующихся в макрофагах, иногда присутствует клатрин, вполне вероятно, что он играет определенную роль не только в пиноцитозе, но и в фагоцитозе. Эти две формы эндоцитоза, однако, четко различаются, поскольку цитохолазин не ингибирует пиноцитоз.

Каким образом псевдоподии, захватившие частицы, сливаются по краям, образуя фагосому? Этот вопрос опять возвращает нас к фундаментальным проблемам, которых мы кратко касались вначале нашего рассмотрения экзоцитоза и эндоцитоза.

6.5.16. Слияние мембран при экзоцитозе и эндоцитозе, вероятно, катализируется специальными белками слияния [52]

Слипание бислоев и *объединение бислоев* представляют собой последовательные этапы слияния мембран. Это фундаментальные клеточно-мембранные процессы, происходящие не только при экзоцитозе и эндоцитозе, но также и при делении или слиянии клеток (рис. 6-86). Ни в одном из этих случаев механизм слияния мембран пока не понят, однако несколько интересных выводов можно сделать из анализа слияния некоторых вирусов, обладающих мембранной оболочкой, с клетками при инфекции. Клеточные мембраны никогда не сливаются самопроизвольно. Для того чтобы мембраны слились, необходимо, чтобы молекулы воды были вытеснены взаимодействующими липидными бислоями, которые бы сблизились до расстояния 1,5 нм между собой. Процесс этот энергети-

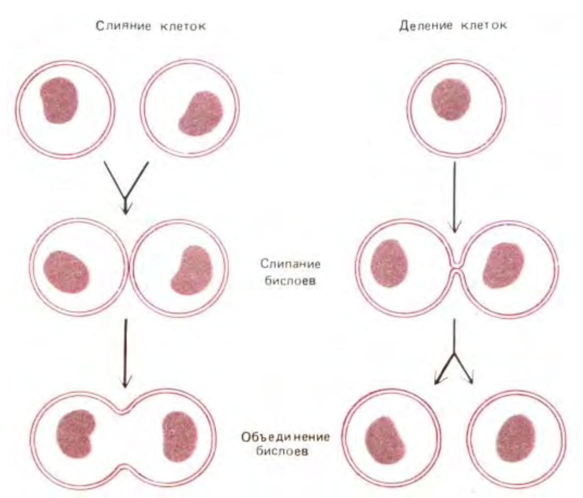


Рис. 6-86. Слияние мембран (включает два этапа: слипание бислоев и их объединение), происходящее при делении и слиянии клеток. В природе слияние клеток наблюдается в процессе оплодотворения (слияние сперматозоида с яйцеклеткой), а также при образовании многоядерных клеток скелетных мышц (слияние миобластов).

чески очень невыгоден. Поэтому весьма вероятно, что слияние всех мембран в клетках катализируется специальными *белками слияния.* Пока такие клеточные белки непосредственно не идентифицированы, однако известно, что у вирусов белки слияния играют ключевую роль в проникновении мембраносодержащих вирусов (т. е. имеющих мембранную оболочку на основе липидного бислоя) внутрь инфицируемой ими клетки (см. разд. 8.9.5). Такие вирусы, как вирус гриппа, например, проникают в клетку путем опосредуемого рецепторами экзоцитоза и попадают в эндосомы. При низком pH в эндосоме активируется белок слияния (фузоген), находящийся в оболочке вируса. Он катализирует слияние вирусной мембраны с мембраной эндосомы. При этом вирусная нуклеиновая кислота высвобождается в цитозоль (рис. 6-87).

Гены, кодирующие несколько вирусных белков слияния, были клонированы и затем использованы для трансфекции эукариотических клеток в культуре. Трансфицированные клетки экспрессировали вирусные белки на поверхности мембраны. При кратковременной инкубации при низких pH эти клетки сливались между собой, образуя гигантскую многоядерную клетку. Для наиболее изученного белка слияния из вируса гриппа была определена трехмерная структура методом рентгеноструктурного анализа (см. разд. 8.6.12). Было показано, что при низком pH в белке слияния индуцируются крупные конформационные изменения, приводящие к экспонированию предварительно спрятанной гидрофобной области на поверхность белка. При этом становятся возможными его взаимодействия с липидным бислоем мембраны-мишени. По-видимому, кластер таких гидрофобных областей, расположенных в близком соседстве друг с другом в молекуле белка слияния, приводит два липидных бислоя в тесное соприкосновение и дестабилизирует их так, что бислои сливаются (рис. 6-87).

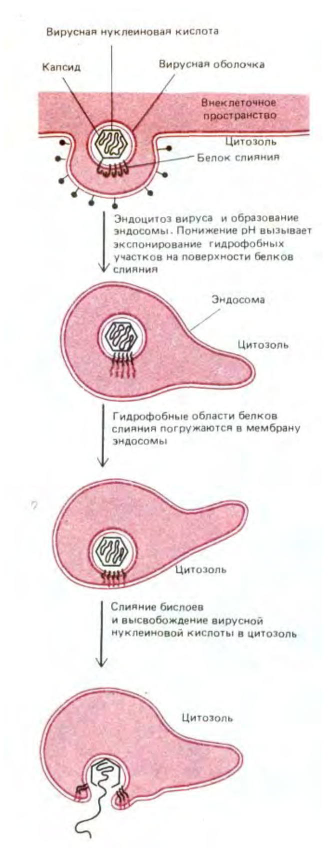


Рис. 6-87. Схема, показывающая, как белки слияния, имеющиеся на поверхности многих вирусов с мембранной оболочкой, катализируют слияние вирусной и эндосомной мембран. Вирусы проникают в клетку путем опосредуемого рецепторами эндоцитоза и попадают в эндосомы; низкий pH внутри эндосом активирует белок, катализирующий слияние мембран. Это позволяет вирусному капсиду высвободиться в цитозоль, где нуклеиновая кислота вируса может реплицироваться.

Заключение

Большинство клеток секретируют и поглощают макромолекулы в процессе соответственно экзоцитоза и эндоцитоза. При экзоцитозе содержимое транспортных или секреторных пузырьков высвобождается во внеклеточное пространство, когда они сливаются с плазматической мембраной. При эндоцитозе процесс идет в обратной последовательности: локальные участки плазматической мембраны впячиваются и замыкаются, образуя эндоцитозный пузырек. Большинство частиц, поглощенных при эндоцитозе, попадает затем в лизосомы, где они подвергаются деградации. Как экзоцитоз, так и эндоцитоз бывают конститутивными и индуцируемыми в ответ на внеклеточные сигналы.

Большинство клеток непрерывно осуществляет эндоцитоз фрагментов своей плазматической мембраны и затем возвращает их обратно на клеточную поверхность в цикле эндоцитоза-экзоцитоза, опосредуемого в основном клатрин-окаймленными ямками и пузырьками. Многие поверхностные рецепторы, связывающие специфические внеклеточные макромолекулы, локализуются в клатриновых окаймленных ямках и как следствие поглощаются в составе окаймленных пузырьков. Этот процесс называется опосредуемым рецепторами эндоцитозом. Окаймленные эндоцитозные пузырьки быстро теряют свою клатриновую оболочку и сливаются с эндосомами, где происходит сортировка рецепторов и лигандов. Большинство лигандов отделяется от рецепторов внутри эндосомы и, в конечном итоге, попадает в лизосомы. А большая часть рецепторов возвращается через транспортные пузырьки обратно на клеточную поверхность для повторного использования. Известны комплексы рецептор - лиганд, которые проходят по другому пути из эндосомного компартмента. Иногда и рецептор, и лиганд попадают в лизосому и деградируют. В некоторых случаях рецептор и лиганд переносятся сквозь клетку, и лиганд высвобождается на другой поверхности клетки путем экзоцитоза. Этот процесс называется трансцитозом.

Литература

Общая

Bretscher M. S. The molecules of the cell membrane. .Sci. Am., **253(4)**, 100-109, 1985.
Datta D. B. A Comprehensive Introduction to Membrane Biochemistry. Madison. Floral., 1987.
Finean J. B. R., Coleman R., Michell R. H. Membranes and Their Cellular Functions, 3rd rd. Oxford, Blackwell, 1984.
Singer S. J., Nicolson G. I. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, **175,** 720-731, 1972.
Veagle P. The Membranes of Cells. Orlando, Academic, 1987.

Цитируемая

1. *Branton D.* Fracture faces of frozen membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55,** 1048-1056, 1966.
Ceve G., Marsh D. Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models. New York., Wiley, 1987.
Gorter E., Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. J. Exp. Med., **41,** 439-443, 1925.
2. *Hawthorne J. N., Ansell G. B.* Phospholipids. New Comprehensive Biochemistry, Vol. 4. Amsterdam, Elsevier, 1982.
Storch J., Kleinfeld A. M. The lipid structure of biological membranes. Trends Biochem. Sci., **10.,** 418-421, 1982.
3. *Bangham A. D.* Models of cell membranes. In: Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology (G. Weissmann, R. Claiborne eds.), pp. 24-34. New York. Hospital Practice, 1975.
Edidin M. Rotational and lateral diffusion of membrane proteins and lipids: phenomena and function. Curr. Top. Memb. Transp., **29,** 91-127, 1987.
Kornberg R. D., McConnell H. M. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68,** 2564-2568, 1971.

4. *Chapman D.* Lipid dynamics in cell membranes. In: Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology (G. Weissmann, R. Claiborne eds.), pp. 13-22. New York, Hospical Practice, 1975.
Chapman D., Benga G. Biomembrane fluidity - studies of model and natural membranes. In: Biological Membranes (D. Chapman ed.), Vol. 5, pp. 1-56. London, Academic, 1984.
Kates M., Manson L. A. eds. Membrane Fluidity. Biomembranes, Vol 12. New York, Plenum, 1984.
Kimelberg H. K. The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. In: Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews (G. Poste, G. L. Nicolson eds.), Vol. 3, pp. 205-293. Amsterdam. Elsevier,
5. *Carruthers A., Melchior D. I.* How bilayer lipids affect membrane protein activity. Trends Biochem. Sci., **11,** 331-335, 1986.
de Kruiff B. et al. Lipid polymorphism and membrane function. In: The Enzymes of Biological Membranes, Vol. 1, Membrane Structure and Dynamics, 2nd ed. (A.N. Martonosi ed.), pp. 131-204. New York, Plenum, 1985.
Kleinfeld A. Current views of membrane structure. Curr. Top. Memb. Transp., **29,** 1-27, 1987.
6. *Bretscher M.* Membrane structure: some general principles. Science, **181,** 622-629, 1973.
Rothman J., Lenard J. Membrane asymmetry. Science, **195**, 743-753, 1977.
7. *Hakomori S.* Glycosphingolipids. Sci. Am., **254(5)**, 44-53, 1986.
Weigandt H. The gangliosides. Adv. Neurochem., **4,** 149-223, 1982.
8. *Eisenberg D.* Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. Anna Rev. Biochem., **53**, 595-623, 1984.
Engelman D. M., Steitz T. A., Goldman A. Identifuing nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **15,** 321-353, 1986.
Henderson R. The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to other membrane proteins. In: Membrane Transduction Mechanisms (R. A. Cone, J.E. Dowling eds.), pp. 3-15. New York, Raven, 1979.
Sefton B. M., Buss J. E. The covalent modification of eukaryotic proteins with lipid. J. Cell Biol, **104**, 1449-1453, 1987.
Unwin N., Henderson R. The structure of proteins in biological membranes. Sci. Am., **250(2),** 78-94, 1984.
9. *Helenius A., Simons K.* Solubilization of membranes by detergents. Biocim. Biophys. Acta, **415,** 29-79, 1975.
Montal M. Functional reconstruction of membrane proteins in planar lipid bilayer membranes. In: Techniques of the Analysis of Membrane Proteins (C. J. Regan, R.J. Cherry eds.), pp. 97-128. London. Chapman and Hall, 1986.
Racker E. Reconstruction of Transporters, Receptors and Pathological States. Orlando, Academic, 1985.
10. *Bretscher M.* Membrane structure: some general principles. Science, **181**, 622-629, 1973.
Steck T. L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. J. Cell Biol., **62**, 1-19, 1974.
11. *Bennet V.* The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. Annu. Rev. Biochem., **54,** 273-304, 1985.
Branton D., Cohen C.M., Tyler J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. Cell, **24**, 24-32, 1981.
Byers T. J., Branton D. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 6153-6157, 1985.
Marchesi V. T. Stabilizing infrastructure of cell membranes. Annu. Rev. Cell Biol., **1,** 531-561, 1985.
Shen B. W., Josephs R., Steck T. L. Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane. J. Cell Biol., **102,** 997-1006, 1986.
12. *Marchesi V. T., Furthmayr H., Tomita M.* The red cell membrane. Annu. Rev. Biochem., **45**, 667-698, 1976.
13. *Jay D., Cantley L.* Structural aspects of the red cell anion exchange protein. Annu. Rev. Biochem., **55,** 511-538, 1986.
Kopito R. R., Lodish H. F. Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. Nature, **316**, 234-238, 1985.
14. *Henderson R.,* Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. Nature, **257**, 28-32, 1975.
Stoeckenius W., Bogomolni R. A. Bacteriorhodopsin and related pigments of Halobacteria. Annu. Rev. Biochem., 51, 587-616, 1982.
15. *Deisenhofer J., Epp. O., Miki K., Huber R., Michel H.* The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3 A resolution. Nature, **318,** 618-624, 1985.
16. *de Petris S., Rqff M.C.* Normal distribution patching and capping of lymphocyte

surface immunoglobulin studied by electron microscopy. Nature New Biol., **241,** 257-259, 1973.
Edidin M. Rotational and lateral diffusion of membrane proteins and lipids: phenomena and function. Curr. Top. Memb. Transp., **29**, 91-127, 1987.
Frye L. D., Edidin M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. J. Cell Sci., **7**, 319-335, 1970.
MvCloskey M., Poo M.-M. Protein diffusion in cell membranes: some biological implications. Int. Rev. Cytpl., **87**, 19-81, 1984.
Poo M., Cone R.A. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. Nature, **247,** 438-441, 1974.
Wier M., Edidin M. Constraint of the translational diffusion of a membrane glycoprotein by its' external domains. Science, **242**, 412-414, 1988.

17. *Gumbiner B., Louvard D.* Localized barriers in the plasma membrane: a common way to form domains. Trends Biochem. Sci., **10,** 435-438, 1985.
Myles D. G., Primakoff P. Sperm surface domains. In: Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine. (T. A. Springer ed.), pp. 239-250. New York, Plenum, 1985.
Simons K., Fuller S. D. Cell Surface Polarity in Epithelia. Annu. Rev. Cell Biol.**, 1,** 243-288, 1985.

18. *Hirano H., Parkhouse B., Nicolson G.L., Lennox E.S., Singer S.J.* Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a myeloma-cell homogenate: its implications for membrane biogenesis. Proc. Natl. Acad Sci. USA, **69**, 2945-2949,1972.
Kornfeld R., Kornfeld S. Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (W.J. Lennarz ed.), pp. 1-84. New York, Plenum, 1980.
Lis H., Sharon N. Lectins as molecules and tools. Annu. Rev. Biochem., **55**, 35-67, 1986.
Olden K., Bernard B. A., Humphries M. J., Yeo T.-K., Yeo K.T., White S.L., Newton S. A., Bauer H. C., Parent J. B. Function of glycoprotein glycans. Trends Biochem. Sci., **10**, 78-82, 1985.

19. *Hille B.* Ionic Channels of Excitable Membranes, Sunderland, MA, Sinauer, 1984.
Martonosi A. N. ed. The Enzymes of Biological Membranes, Vol. 3, Membrane Transport, 2nd ed. New York, Plenum, 1985.
West I. S. The Biochemistry of Membrane Transport. London, Chapman and Hall, 1983.
Stein W.D. Transport and Diffusion Across Cell Membranes Orlando, Academic, 1986.

20. *Andersen 0. S.* Permeability properties of unmodified lipid bilayer membranes. In: Membrane Transport in Biology. Vol. 1 (G. Giebisch, D. C. Tosteson, H. H. Ussing eds.), pp. 369-446. New York, Springer-Verlag, 1978.
Finkelstein A. Water movement through membrane channels. Curr. Top. Memb. Trans., 21, 295-308, 1984.
Walter A., Gutknecht J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. J. Membr. Biol., 90, 207-217, 1986.

21. *Hobbs A.S., Alberts R. W.* The structure of proteins involved in active membrane transport. Annu. Biophys. Bioeng., **9**, 259-291, 1980.
Kyte J. Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport. Nature, **292**, 201-204, 1981.
Stein W. D. ed. Ion pumps: Structure, function and regulation. New York, Alan Liss, 1988.
Tanford C. Mechanism of the energy coupling in active transport. Annu. Rev. Biochem., **52**, 379-409, 1983.
Wilson D.B. Cellular transport mechanisms. Annu. Rev. Biochem., **47**, 933-965, 1978.

22. *Cantley L. C.* Structure and mechanisms of the (Na, K) ATPase. Curr. Topics Bioenerget., **11**, 201-237, 1981.
Glynn I. M., Ellory C. eds. The Sodium Pump. Cambridge, U. K. The Company of Biologists, 1985.
Shull G. E., Schwartz A., Lingrel J. B. Amino acid sequence of the catalytic subunit of the (Na^+-K^+) ATPase deduced from a complementary DNA. Nature, **316,** 691-695, 1985.

23. *Swecdner K. J., Goldin S. M.* Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. N. Engl. J. Med., **302**, 777-783, 1980.
Glynn I.M. The Na^+-K^+ transporting adenosine triphosphatase. In: The Enzymes of Biological Membranes, 2nd ed. (A. Martonosi ed.), Vol. 3, pp. 34-114. New York, Plenum, 1985.

24. *Hassebach W., Oetliker H.* Energetics and electrogenicity of the sarcoplasmic reti :ulum calcium pump. Annu. Rev. Physiol., **45**, 325-339, 1983.
MacLennan D. H., Brandl C. J., Korezak B., Green N. M. Amino acid sequence of a Ca^{2+}, Mg^{2+}-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. Nature, **316**, 696-700, 1985.
Schatzman H.J. The red cell calcium pump. Annu. Rev. Physiol., **45**, 303-312, 1983.

25. *Hinkle P.C., McCarty R.E.* How cell make ATP. Sci. Am., **238(3)**, 104-123, 1978.
Nicholls D. G. An Introduction to the Chemiosmotic Theory, 2nd ed. New York, Academic, 1987.
26. *Scott D. M.* Sodium cotransport systems: cellular, molecular and regulatory aspects. Bioessays, **7,** 71-78, 1987.
Wright J. K., Seckler R., Overath P. Molecular aspects of sugar: ion transport. Annu. Rev. Biochem., **55**, 225-248, 1986.
27. *Grinstein S., Rotnstein A.* Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. J. Membrane Biol., **90,** 1-12, 1986.
Olsnes S., Tonnessen T. I., Sandvig K. pH-regulation anion antiport in nucleated mammalian cells. J. Cell Biol., **102**, 967-971, 1986.
Pouyssegur J., Franchi A., Kohno M., L'Allemain G., Paris S. Na^+-H^+ exchange and growth control in fibroblasts: a genetic approach. Curr. Top. Memb. Transp., **26**, 201-220, 1986.
Rozengunt E., Mendoza S. Early stimulation of Na^+-H^+ antiport, Na^+-K^+ pump activity and Ca^{2+} fluxes in fibroblast mitogenesis. Curr. Top. Membr. Transp., **27,** 163-191, 1986.
28. *Aimers W., Stirling C.* Distribution of transport proteins over animal cell membranes. J. Membrane Biol. **77**, 169-186, 1984.
Semenza G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: Glycosidases and peptidases of Enterocytes and renal tubuli. Annu. Rev. Cell Biol., **2**, 255-313, 1986.
29. *Postma P. W., Longeler J. W.* Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. Microbiol. Rev., **49**, 232-269, 1985.
30. *Ames G. F. L.* Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. Annu. Rev. Biochem., **55**, 397-425, 1986.
31. *Hille B.* Ionic Channels of Excitable Membranes, Sunderland, MA, Sinauer, 1984.
32. *Baker P. F., Hodgkin A. L., Shaw T. L.* The effects of changes in internal ionic concentration on the electrical properties of perfused giant axons. J. Physiol., **164,** 355-374, 1962.
Hodgkin A. L., Keynes R. D. Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. Physiol., **128**, 26-60, 1955.
Kuffler S.W., Nicholls J. G., Martin A. R. From Neuron to Brain, pp. 111-125, Sunderland MA, Sinauer, 1984.
33. *Hodgkin A. L., Huxley A. F.* A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol.**,** **117**, 500-544, 1952. Kuffler S.W., Nicholls J. G., Martin A. R. From Neuron to Brain, pp. 125-152. Sunderland MA, Sinauer, 1984.
34. *Catterall W.A.* Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. Annu. Rev. Biochem., **55**, 953-985, 1986.
Noda M. et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature, **312,** 121-127, 1984.
Sigworth F. J., Neher E. Single Na^+ channel currents observed in cultured rat muscle cells. Nature, **287**, 447-449, 1980.
Stevens C.F. Biophysical studies of ion channels. Science**, 225**, 1346-1350, 1984.
Tanabe T. et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. Nature, **328**, 313-318, 1987.
35. *Grenningloh G. et al.* The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. Nature**, 328**, 215-220, 1987.
Guy H. R., Hucho F. The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor Trends Neurosci., **10**, 318-321, 1987.
Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, pp. 117-138 and 335-360. Sunderland MA, Sinauer, 1984.
Noda M. et al. Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. Nature, **302,** 528-532, 1983.
Schoefield P. R. et al. Sequence and functional expression of the $GABA_A$ receptor shows a ligand-gated receptor super family. Nature, **328**, 221-227, 1987.
36. *Stevens C. F.* The neuron. Sci. Am., **241(3)**, 54-65, 1979.
37. *Gomperts B. D.* The Plasma Membrane: Models for Its Structure and Function, pp. 109-212. New York, Academic Press, 1976.
Pressman B. C. Biological applications of ionophores. Annu. Rev. Biocem., **45**, 501-530, 1976.
38. *Burgess T. L., Kelly R. B.* Constitutive and regulated secretion of proteins. Annu. Rev. Cell Biol., **3**, 243-294, 1987.
39. *Lawson D., Fewtrell C., Raff M.* Localized mast cell degranulation induced by cpncanavalin A-sepharose beads: implications for the Ca^{2+} hypothesis of simulus-secretion coupling. J. Cell Biol., **79**, 394-400, 1978.
40. *Steinman R. M., Mellman I. S., Mutter W. A., Cohn Z.* Endocytosis and recycling of plasma membrane. J. Cell Biol., **96,** 1-27, 1983.
41. *Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S.* Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. Nature, **279**, 679-685, 1979.

Roth T. F., Porter K. R. Volk protein uptake in the oocyte of the mosquito, *Aedes aegypti.* L. J. Cell Biol., **30,** 313-332, 1964.
42. *Pearse B. M. F., Bretscher M. S.* Membrane recycling by coated vesicles. Annu. Rev. Biochem., **50,** 85-101, 1981.
Pearse B.M.F., Growther R.A. Structure and assembly of coated vesicles. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **16,** 49-68, 1987.
Schmid S. L., Rothman J. E. Enzymatic dissociation of clathrin in a two-stage process. J. Biol., **260**, 10044-10049, 1985.
43. *Orci L., Click B. S., Rothman J. E.* A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. Cell, **46,** 171-184, 1986.
Simionescu N., Simionescu M., Palade G.E. Premeability of muscle capillaries to small heme-peptides: evidence for the existence of patent transendothelial channels. J. Cell Biol., 64, 586-607, 1975.
44. *Brown M. S., Goldstein J. L.* How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. Sci., Am., **251(5),** 58-66, 1984.
Brown M. S., Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, **232**, 34-48, 1986.
45. *Brown W.J., Goodhouse J., Farquhar M,G.* Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. J. Cell Biol., **103,** 1235-1247, 1986.
Griffiths G., Hoflack B., Simons K., Mellman I., Kornfleld S. The mannose-6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. Cell, 52, 329-341, 1988.
Helenius A., Mellman I., Wall D., Hubbard A. Endosomes. Trends Biochem. Sci., **8,** 245-250, 1983.
Mellman L, Howe C., Helenius A. The control of membrane traffic on the endocytis pathway. Curr. Top. Memb. Transp., **29**, 255-288, 1987.
46. *Carpenter G.* Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Annu. Rev. Biochem.**, 56,** 881-914, 1987.
Dautry-Varsat A., Ciechanover A., Lodish H.F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80,** 2258-2262, 1983.
Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G. W., Russell D. W., Schneider W.J. Receptor-mediated endocytosis. Annu. Rev. Cell Biol., **1**, 1-39, 1985.
Mellman L, Fuchs R., Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Annu. Rev. Biochem., **55**, 663-700, 1986.
47. *Mostov K.E., Simister N.E.* Transcytosis. Cell, **43,** 389-390, 1985.
Rodewald R., Abrahamsom D. R. Receptor-mediated transport of IgG across the intestinal epithelium of the neonatal rat. In: Membrane Recycling (Ciba Foundation Symposium 92), pp. 209-232. London, Pitman, 1982.
48. *Helenius A., Marsh M.* Endocytosis of enveloped animal viruses. In: Membrane Recycling (Cida, Foundation Symposium 92), pp. 59-76. London, Pitman, 1982.
Thilo I. Quantification of endocytosis-derived membrane traffic. Biochim. Biophys. Acta, **822,** 243-266, 1985.
49. *Abercrombie M., Haysman J. E. M., Pegrum S. M.* The locomotion of fibroblasts in culture. III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. Exp. Cell Res., **62**, 389-398, 1970.
Bretscher M. S. Endocytosis: relation to capping and cell locomotion. Science, **224,** 681-686, 1984.
Taylor R.B., Duffus W.P.H., Raff M. C., de Petris S. Redistribution and pinocytosis of limphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin intobody. Nature New Biol**., 233,** 225-229, 1971.
50. *Wright S. D., Silverstein S. C.* Overview: the function of receptors in phagocytosis. In: Handbook of Experimental Immunology, 4th ed. (D. M. Weir, L. Herzenberg eds.), pp. 41-1-41-14. Oxford UK, Blackwell, 1983.
51. *Aggeler J., Werb Z.* Initial events during phagocytosis by macrophages viewed from outside and inside the cell: Membrane-particle interaction and clathrin. J. Cell Biol., **94,** 613-623, 1982.
Griffin F. M., Jr., Griffin J. A., Silverstein S. C. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. J. Exp. Med., **144,** 788-809, 1976.
Griffin F. M., Jr., Silverstein S. C. Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus. J. Exp. Med., **139**, 323-336, 1974.
52. *Blumenthal R.* Membrane Fusion. Curr. Top. Memb. Transp., **29**, 203-254, 1987.
Gething M. J., Doms R., York D., White J. Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. J. Cell Biol., **102,** 11-23, 1986.
White J., Kielian M., Helenius A. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. Quart. Rev. Biophys., **16,** 151-195, 1983.
Wiley D. C., Skehel J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Annu. Rev. Biochem., **56**, 365-394, 1987.

Митохондрии, имеющиеся во всех эукариотических клетках, и свойственные только растениям **пластиды** (из которых наибольший интерес представляют **хлоропласты)** преобразуют энергию в формы, которые могут быть использованы для проведения внутриклеточных реакций. Специфическую функцию этих органелл отражает наиболее поразительная черта их морфологии - обилие внутренних мембран. Мембраны выполняют в этих *энергопреобразующих органеллах* две ключевые функции. Во-первых, они осуществляют процессы переноса электронов, в результате которых энергия реакций окисления (см. разд. 2.2.4) преобразуется в более полезные формы, главным образом в энергию АТР. Во-вторых, мембраны образуют в органелле большие внутренние компартменты, в которых находятся ферменты, катализирующие другие внутриклеточные реакции.

Без митохондрий животная клетка могла бы получать АТР только за счет анаэробного гликолиза. Но в результате превращения глюкозы в пируват, происходящего при гликолизе (разд. 2.3.2), высвобождается лишь малая часть всей свободной энергии, которую можно получить при окислении Сахаров. В митохондриях метаболизм Сахаров (и жирных кислот) доводится до конца: пируват (как и жирные кислоты) окисляется молекулярным кислородом (O_2) до CO_2 и H_2O. Энергия, высвобождаемая при таком окислении, используется настолько эффективно, что на каждую молекулу окисляемой глюкозы образуется около 36 молекул АТР, в то время как при гликолизе на одну молекулу глюкозы приходится только 2 молекулы АТР. Хлоропласты - это тоже очень эффективные «машины» для выработки АТР, но источником энергии для них служит солнечный свет, а не сахара и жирные кислоты. Несмотря на такое фундаментальное различие, митохондрии и хлоропласты организованы сходно и синтезируют АТР одним и тем же способом.

Общий путь, по которому митохондрии, хлоропласты и даже бактерии преобразуют энергию для биологических целей, основан на процессе, получившем название *хемиосмотического сопряжения.* Этот процесс начинается с того, что электроны, «богатые энергией», передаются от сильных доноров этих частиц по цепи из переносчиков электронов, встроенных в мембрану, непроницаемую для ионов. При таком переносе по **электронтранспортной цепи** электроны, которые были либо возбуждены солнечным светом, либо извлечены при окислении питательных веществ, последовательно переходят на все более низкие энергетические уровни. Часть высвобождаемой энергии используется для перемещения протонов с одной стороны мембраны на другую, в результате чего на мембране создается *электрохимический протонный градиент.* За счет энергии этого градиента протекают реакции, катализируемые ферментами, встроенными в ту же мембрану (рис. 7-1). В митохондриях и хлоропластах большая часть энергии используется для превращения ADP и P_i в АТР, хотя некоторая ее доля расходуется на транспорт специфических метаболитов в органеллу и из нее. В отличие от этого у бактерий электрохимический градиент служит столь же важным непосредственным источником энергии, как и синтезируемый с его помощью АТР: благодаря энергии градиента осуществляются не только многие транспортные процессы, но и быстрое вращение бактериальных жгутиков, перемещающих клетку (разд. 12.5.4).

Как полагают, преобразующие энергию органеллы эукариот произошли от прокариотических клеток, которые были захвачены примитивными эукариотами и вступили с ними в симбиоз 1,5 млрд. лет назад. Этим можно объяснить, почему митохондрии и хлоропласты имеют

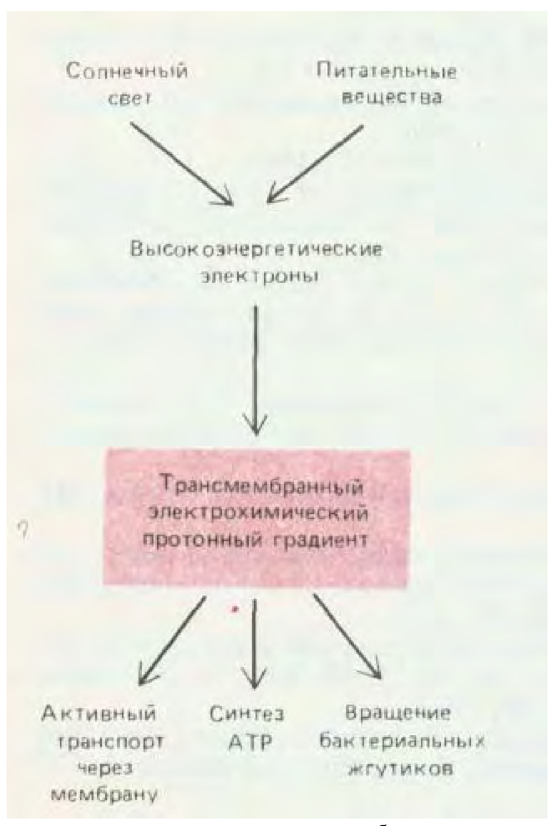


Рис. 7-1. Хемиосмотическое сопряжение используется всеми клетками для преобразования энергии. За счет энергии солнечного света или окисления питательных веществ сначала создается трансмембранный электрохимический протонный градиент. Этот градиент и служит источником энергии для разнообразных процессов, происходящих в митохондриях, хлоропластах и бактериальных клетках.

свою собственную ДНК, кодирующую некоторые белки этих органелл. Однако к настоящему времени митохондрии и хлоропласты утратили большую часть собственного генома и стали полностью зависеть от белков, кодируемых ядерными генами, синтезируемых в цитозоле и лишь затем переносимых в органеллу. И наоборот, клетки-хозяева стали зависимы от этих органелл, дающих значительную часть АТР, необходимого для биосинтезов, активного транспорта ионов и растворенных веществ и двигательных функций, а также содержащих ряд ферментов, катализирующих некоторые реакции биосинтеза.

7.1. Митохондрии

Митохондрии занимают значительную часть цитоплазмы почти во всех эукариотических клетках. Хотя митохондрии настолько велики, что их можно увидеть в обычный световой микроскоп, и впервые были обнаружены еще в прошлом веке, все же реальная возможность разобраться в их функции появилась только после 1948 г., когда были разработаны методы выделения интактных митохондрий. По техническим причинам большинство биохимических исследований проводилось на митохондриях, выделенных из печени.

Митохондрии обычно изображают в виде жестких вытянутых, похожих на бактерии цилиндров диаметром от 0,5 до 1 мкм. Однако цейтраферная микрокиносъемка живых клеток позволяет увидеть, что митохондрии - необыкновенно подвижные и пластичные органеллы, которые постоянно изменяют свою форму (рис. 7-2) и даже сливаются друг с другом и затем вновь разделяются. Пути перемещения митохондрий в цитоплазме часто связаны с микротрубочками (рис. 7-3), что может определять характерную ориентацию митохондрий и распределение их в различных клетках. В некоторых клетках митохондрии образуют длинные подвижные филаменты или цепочки, а в других они фиксированы вблизи мест высокого потребления АТР-например, в сердечной мышце они располагаются между миофибриллами, а в сперматозоидах плотно обвивают жгутик (рис. 7-4).

7.1.1. Митохондрии имеют наружную и внутреннюю мембраны, образующие два внутренних компартмента [2]

Каждая митохондрия окружена двумя высокоспециализированными мембранами, играющими ключевую роль в ее активности. Мембраны

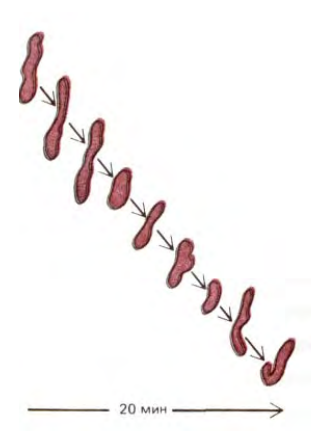


Рис. 7-2. Быстрое изменение формы митохондрий, наблюдаемое в живых клетках.

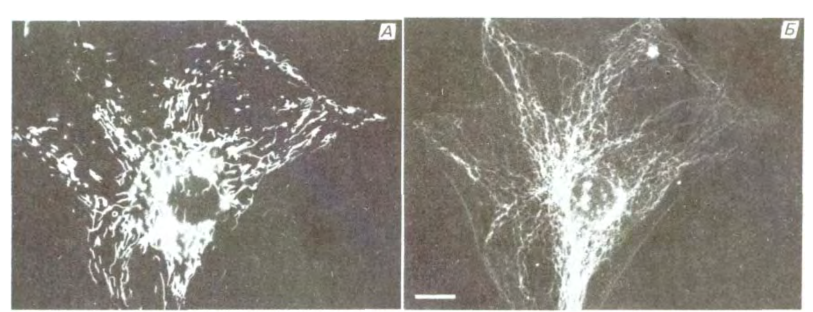


Рис. 7-3. *А.* Световая микрофотография цепочек вытянутых митохондрий в живой клетке в культуре ткани млекопитающего. Клетка обработана витальным флуоресцентным красителем (родамином 123), специфически окрашивающим митохондрии. *Б.* Иммунофлуоресцентная микрофотография той же самой клетки, обработанной (после фиксации) флуоресцентными антителами к микротрубочкам. Обратите внимание, что митохондрии располагаются в основном вдоль микротрубочек. Масштабный отрезок 10 мкм. (С любезного разрешения Lan Bo Chen.)

образуют два изолированных митохондриальных компартмента: внутренний **матрикс** и значительно более **узкое межмембранное пространство.**

Если очищенные митохондрии осторожно разрушить и затем разделить на фракции (рис. 7-5), можно определить биохимический состав каждой из двух мембран и заключенных между ними пространств. Как показано на рис. 7-6, каждая фракция содержит уникальный набор белков.

В состав **наружной мембраны** входит много копий белка, называемого *порином,* который образует широкие гидрофильные каналы в липидном бислое. Таким образом, эта мембрана напоминает сито, проницаемое для всех молекул массой 10000 дальтон и меньше, включая небольшие белки. Эти молекулы могут проникать в межмембранное пространство, но большая их часть не способна проходить через непроницаемую внутреннюю мембрану. Это означает, что если химический состав межмембранного пространства эквивалентен составу цитозоля хотя бы в отношении молекул малого размера, то матрикс содержит гораздо более ограниченный набор небольших молекул.

Как будет подробнее описано позже, основная рабочая часть митохондрии - это матрикс и окружающая его **внутренняя мембрана.** /Внутренняя мембрана высокоспецифична, она содержит большое количество «двойного» фосфодипида *кардиолипина* (разд. 7.5.15), что как полагают, и делает мембрану особенно непроницаемой для ионов. В состав внутренней мембраны входят также разнообразные транспортные белки, обусловливающие ее избирательную проницаемость для тех малых молекул, которые либо метаболизируются многочисленными ферментами, сконцентрированными в матриксе, либо необходимы для их активности. В частности, матрикс содержит ферменты, превращающие пируват и жирные кислоты в ацетил-СоА и затем окисляющие последний в цикле лимонной кислоты. Главные конечные продукты этого окисления - CO_2, выходящий из клетки, и NADH, который служит главным источником электронов, переносимых **дыхательной цепью -** так называется электронтранспортная цепь митохондрий. Ферменты дыхательной цепи встроены во внутреннюю митохондриальную мембрану и необходимы для процесса *окислительного фосфорилирования,* дающего большую часть АТР в животных клетках.

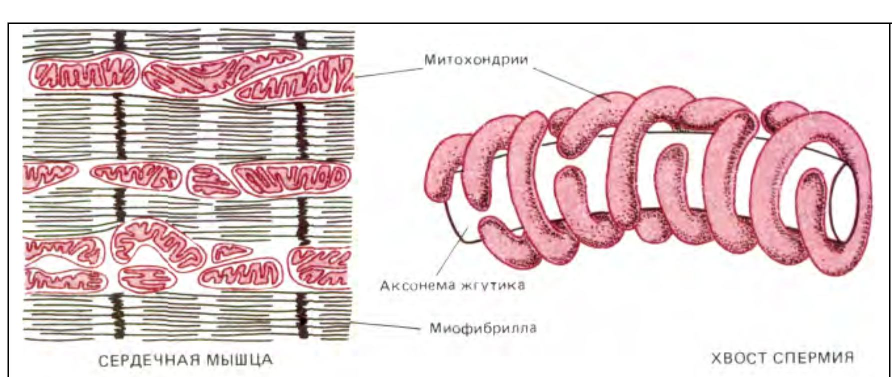


Рис. 7-4. Локализация митохондрий вблизи мест высокого потребления АТР в сердечной мышце и в хвосте спермия. В ходе развития жгутика спермия микротрубочки обвивают аксонему и обеспечивают тем самым надлежащее расположение митохондрий.

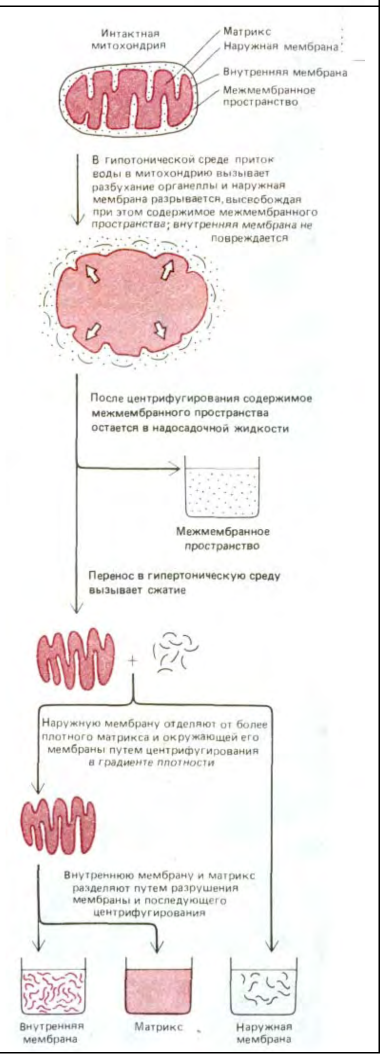


Рис. 7-5. Методы разделения митохондрий на отдельные компоненты дают возможность изучать различные белки в каждом компартменте митохондрии. Представленный здесь метод, позволяющий одновременно обрабатывать большое количество митохондрий, основан на том, что в среде с низкой ионной силой вода проникает в митохондрию и вызывает сильное набухание матрикса. При этом кристы внутренней мембраны расправляются, а наружная мембрана, не имеющая складок, разрывается, высвобождая структуру, состоящую только из внутренней мембраны и матрикса.



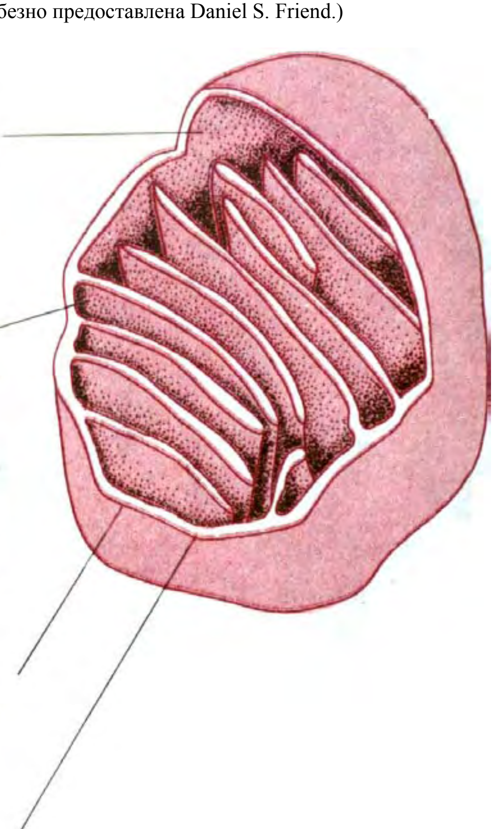
Рис. 7-6. Общее строение митохондрии. В митохондриях печени 67% всего белка находится в матриксе, 21% - в наружной мембране, 6% - во внутренней мембране и 6% - в межмембранном пространстве. Каждый из этих четырех компартментов в соответствии со своей функцией содержит определенный набор ферментов (см. схему внизу). (Микрофотография любезно предоставлена Daniel S. Friend.)

Матрикс. Матрикс содержит высококонцентрированную смесь из сотен различных ферментов, в том числе ферменты, необходимые для окисления пирувата и жирных кислот, и ферменты цикла лимонной кислоты. Кроме того, там находятся несколько идентичных копий митохондриальной ДНК, специфические митохондриальные рибосомы, тРНК и различные ферменты, участвующие в экспрессии митохондриального генома.

Внутренняя мембрана. Эта мембрана образует многочисленные складки, увеличивающие общую поверхность мембраны. В ней содержатся белки трех главных типов: 1) белки, катализирующие окислительные реакции в дыхательной цепи; 2) ферментный комплекс, называемый *АТР-синтетазой,* который синтезирует в матриксе АТР; 3) специфические транспортные белки, регулирующие перенос метаболитов в матрикс и из него. Так как электрохимический градиент, энергию которого использует АТР-синтетаза, создается на этой мембране при участии дыхательной цепи, важно, чтобы мембрана была непроницаема для большей части малых ионов.

Наружная мембрана. Так как наружная мембрана содержит белок (так называемый порин), образующий широкие каналы, она проницаема для всех молекул массой до 10 000 дальтон. Кроме того, в состав этой мембраны входят ферменты, участвующие в синтезе митохондриальных липидов и переводящие липидные субстраты в такие формы, которые затем метаболизируются в матриксе.

Межмембранное пространство. Здесь находится несколько ферментов, которые используют выходящий из матрикса АТР для фосфорилирования других нуклеотидов.



7.1.2. Внутренняя мембрана образует складки - кристы [3]

Внутренняя мембрана обычно образует в матриксе сложную систему складок, называемых кристами. Эти складки значительно увеличивают площадь внутренней мембраны; например, в митохондриях печени внутренняя мембрана составляет третью часть всех мембран клетки (см. табл. 8-2). В митохондриях сердечной мышцы число крист в три раза больше, чем в митохондриях печени, что, по-видимому, связано с высокой потребностью клеток сердца в АТР. Кроме того, кристам митохондрий в различных клетках свойственны поразительные морфологические особенности, значение которых неизвестно (рис. 7-7).

Помимо морфологических особенностей разные типы клеток существенно различаются по составу митохондриальных ферментов. Однако в этой главе мы отвлечемся от различий и рассмотрим лишь ферменты и свойства, общие для всех митохондрий.

7.1.3. Окислительные процессы в митохондриях начинаются после образования в матриксе достаточного количества ацетил-CoA из пирувата и жирных кислот [4]

«Топливом» для окислительного метаболизма в митохондриях служат главным образом жирные кислоты и пируват, образуемый в результате гликолиза в цитозоле. Эти вещества избирательно транспортируются из цитозоля в митохондриальный матрикс, где распадаются до двухуглеродных групп, присоединенных к ацетилкоферменту А (ацетил-CoA, рис. 7-8). В составе молекулы ацетил-CoA каждая ацетильная группа поступает затем в цикл лимонной кислоты для дальнейшего расщепления. Процесс заканчивается переносом по дыхательной цепи богатых энергией электронов, извлеченных из ацетильной группы.

Для того чтобы обеспечить непрерывное снабжение окислительного метаболизма «топливом», животные клетки запасают его в виде жиров, служащих источником жирных кислот, и гликогена - источника глюкозы. которая потом расщепляется до пирувата. В количественном отношении жиры гораздо более важны хотя бы потому, что при их окислении



Рис. 7-7. Некоторые морфологические различия в строении крист митохондрий, выделенных из разных тканей крысы. Значение этих различий для функционирования митохондрий не известно.

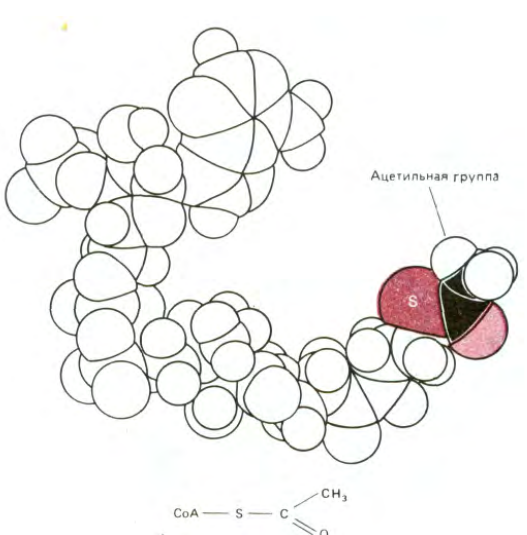


Рис. 7-8. Ацетил-CoA - главный промежуточный продукт, образующийся при расщеплении питательных веществ в митохондриях. На рисунке изображена пространственная модель этой молекулы (см. также рис. 2-19). S - атом серы, образующий с ацетатом тиоэфирную связь. Так как эта связь высокоэнергетическая, ацетатная группа может быть легко перенесена на другую молекулу, такую как оксалоацетат (см. *рис.* 7-14).

освобождается в шесть с лишним раз больше энергии, чем при окислении равного количества гликогена в его гидратированной форме. Запасов гликогена в организме среднего взрослого человека достаточно на один день нормальной активности, тогда как запаса жиров хватит на месяц. Если бы главным резервом топлива в нашем организме служил гликоген, а не жиры, вес тела увеличился бы в среднем на 25 кг.

Основная часть жировых запасов находится у нас в жировой ткани, откуда по мере надобности жиры транспортируются с током крови к остальным клеткам. Потребность в жирах возрастает после некоторого периода голодания; даже после ночного сна происходит мобилизация жира, так что в утренние часы большая часть ацетил-СоА, поступающего в цикл лимонной кислоты, извлекается из жирных кислот, а не из глюкозы. Однако после еды главным источником ацетил-СоА для цикла лимонной кислоты становится глюкоза, полученная с пищей. Избыток этой глюкозы идет на восполнение истощенных запасов гликогена или на синтез жиров. (Следует отметить, что хотя сахара в животных клетках легко переводятся в жиры, последние не могут превращаться в сахара.)

Молекула жира состоит из трех остатков жирных кислот, присоединенных эфирными связями к молекуле глицерола. Такие *триацилглицеролы* (триглицериды) неполярны и практически нерастворимы в воде - в цитозоле они образуют жировые капельки (рис. 7-9). В *адипоцитах* -- клетках жировой ткани - одна большая капля жира занимает почти весь клеточный объем; крупные жировые клетки специализированы для хранения жира. Мелкие жировые капельки обычны для таких клеток, как волокна сердечной мышцы, использующие энергию расщепления жирных кислот; жировые капли в этих клетках часто бывают тесно связаны с митохондриями (рис. 7-Ю). Во всех клетках ферменты наружной и внутренней мембран митохондрий участвуют в переносе жирных кислот, извлеченных из молекул жира, в митохондриальный матрикс. В матриксе каждая молекула жирной кислоты (в виде *ацил-СоА)* полностью расщепляется в цикле реакций, за каждый оборот которого она укорачивается с карбоксильного конца на два атома углерода и образуется одна молекула ацетил-СоА (рис. 7-11). Дальнейшее окисление ацетил-СоА происходит в цикле лимонной кислоты.

Гликоген представляет собой большой разветвленный полимер глюкозы, содержащийся в виде гранул в цитоплазме (рис. 7-12); синтез и распад гликогена с высокой степенью точности регулируется нуждами организма (см. разд. 12.4.1). При повышении потребности в глюкозе гликоген расщепляется с образованием глюкозо-1-фосфата. В процессе гликолиза шестиуглеродная молекула глюкозы (или родственного ей сахара) превращается в две трехуглеродные молекулы пирувата (см. разд. 2.3.2), еще сохраняющие большую часть энергии, которая может быть извлечена при полном окислении сахара. Эта энергия высвобождается только после переноса пирувата из цитозоля в митохондриальный матрикс, где пируват подвергается воздействию мультиферментного комплекса, который крупнее рибосомы, - *пируватдегидрогеназного комплекса.* Этот комплекс, содержащий множественные копии трех ферментов, пяти коферментов и двух регуляторных белков, быстро превращает пируват в ацетил-СоА (при этом в качестве побочного продукта выделяется CO_2) (рис. 7-13). Этот ацетил-СоА, так же как и ацетил-СоА, образующийся при окислении жирных кислот, поступает в цикл лимонной кислоты.

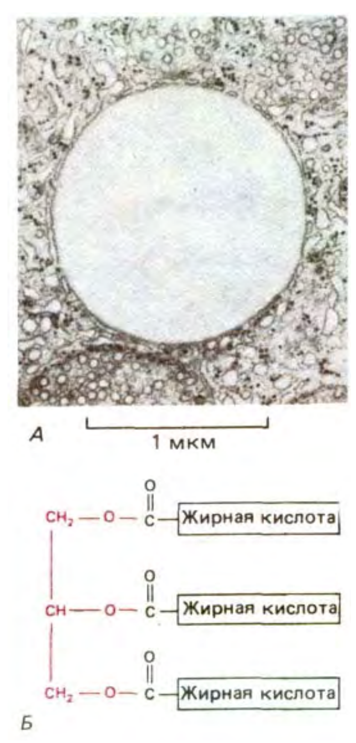


Рис. 7-9. *А.* Электронная микрофотография жировой капельки, содержащей триацилглицеролы основную форму резервных жиров в цитоплазме. *Б.* Строение триацилглицерола; цветом выделен остаток глицерола. (Фото *А* любезно предоставлено Daniel S. Friend.)

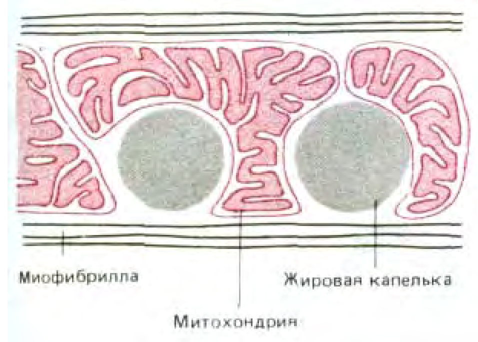


Рис. 7-10. В клетках сердечной мышцы жировые капельки окружены митохондриями, в которых происходит окисление жирных кислот, извлекаемых из триацилглицеролов.

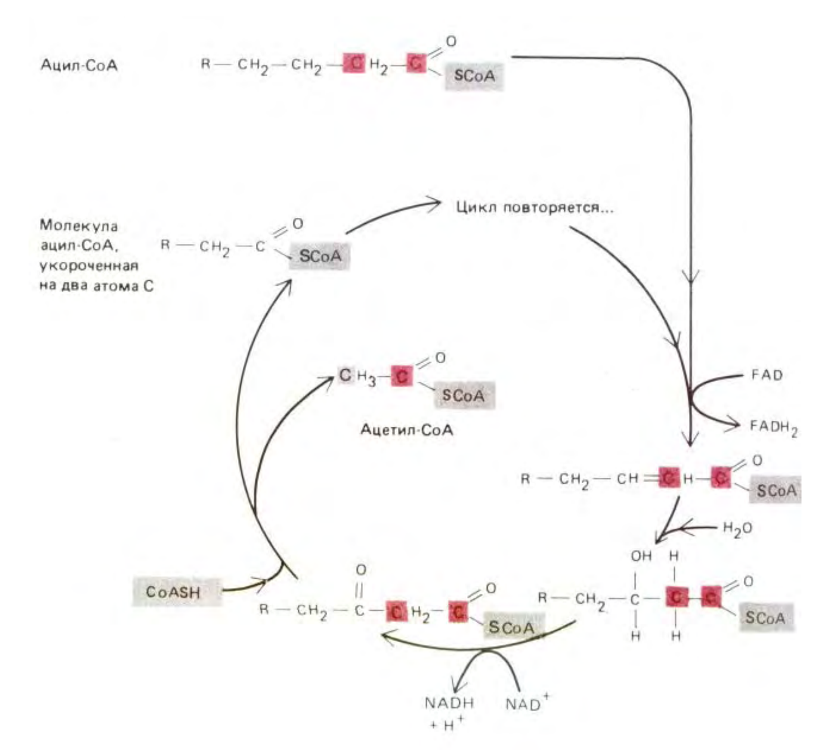


Рис. 7-11. Цикл окисления жирных кислот, этапы которого последовательно катализируются в митохондриальном матриксе четырьмя ферментами. За каждый оборот цикла молекула жирной кислоты укорачивается на два углеродных атома (выделены цветом) и образуется одна молекула ацетил-CoA и по одной молекуле NADH и $FADH_2$. NADH свободно растворяется в матриксе, в то время как $FADH_2$ остается тесно связанным с ферментом *ацил-CoA-дегидрогеназой;* два электрона $FADH_2$ быстро переносятся на убихинон, находящийся во внутренней мембране митохондрии (разд. 7.2.5), и при этом регенерируется NAD. Представленный здесь четырехступенчатый путь окисления жирных кислот идентичен по своей химической сущности расщеплению многих других углерод-углеродных связей (см., например, рис. 7-14).

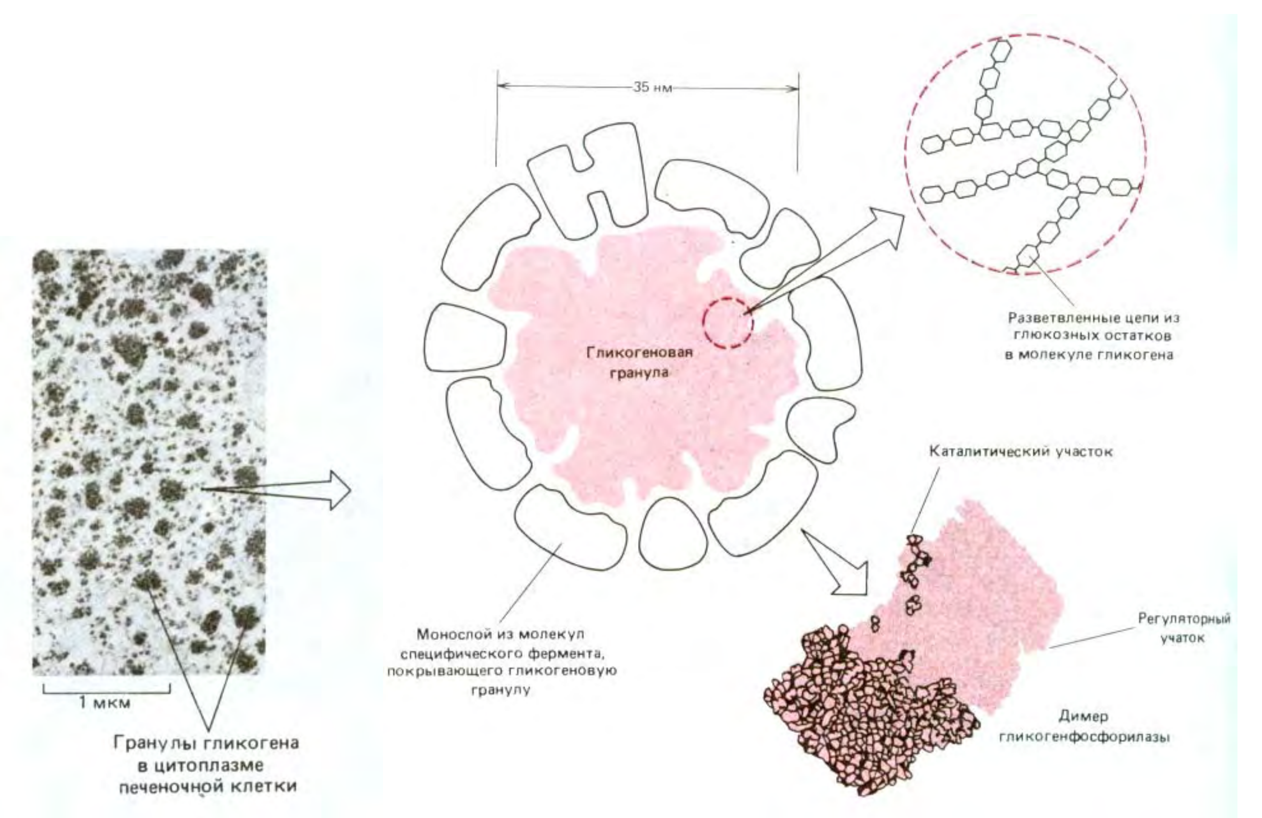


Рис. 7-12. Электронная микрофотография и схематическое изображение гранул гликогена - главной резервной формы углеводов в клетках позвоночных. Гликоген - это полимер глюкозы, и каждая гранула представляет собой единственную сильно разветвленную молекулу. Синтез и расщепление гликогена катализируют ферменты, связанные с поверхностью гранул, в том числе *гликогенсинтаза* и расщепляющий фермент *гликогенфосфорилаза. (С* любезного разрешения Robert Fletterick и Daniel S. Friend.)

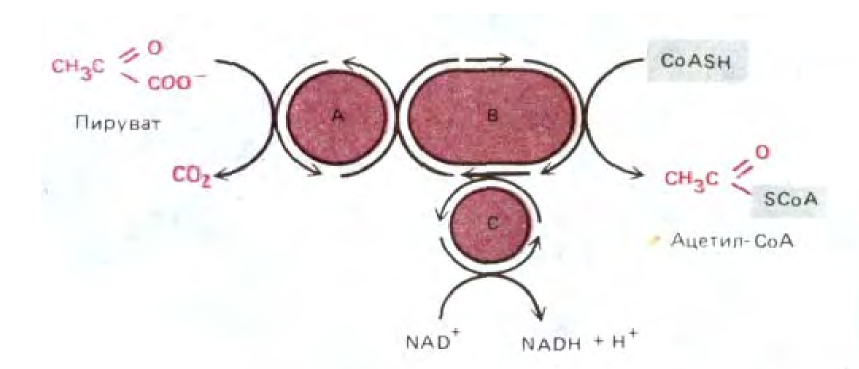


Рис. 7-13. Реакции, осуществляемые пируватдегидрогеназным комплексом, превращающим пируват в ацетил-CoA в митохондриальном матриксе; в ходе этих реакций также образуется NADH. A, B, C - это три фермента: *пируватдегидрогеназа, дигидролипоил-трансацетилиза* и *дигидролипоил-дегидрогеназа,* функции которых сопряжены, как показано на рисунке. Строение комплекса изображено на рис. 2-40; комплекс содержит также протеинкиназу и протеинфосфатазу, которые регулируют активность пируватдегидрогеназы, «отключая» ее при высоких концентрациях ATP.

7.1.4. Окисление ацетильной группы до ацетил-CoA в цикле лимонной кислоты ведет к образованию молекул NADH и $FADH_2$ для дыхательной цепи [5]

Еще в прошлом веке биологи заметили, что в отсутствие воздуха (в анаэробных условиях) клетки образуют молочную кислоту (или этанол), тогда как в аэробных условиях они используют кислород, образуя CO_2 и H_2O. Усилия по выяснению путей аэробного метаболизма в конце концов сосредоточились на окислении пирувата и привели в 1937 г. к открытию **цикла лимонной кислоты,** называемого также *циклом трикарбоновых кислот* или *циклом Кребса.* В большинстве клеток в цикле лимонной кислоты происходит около двух третей всех реакций окисления углеродных соединений. Главные конечные продукты этого цикла - *CO_2* и NADH. CO_2 выделяется как побочный продукт, а молекулы NADH передают свои богатые энергией электроны в дыхательную цепь, в конце которой эти электроны используются для восстановления O_2 до H_2O.

Цикл лимонной кислоты начинается с взаимодействия между ацетил-CoA, образованным из жирных кислот или пирувата, и четырехуглеродным соединением *оксалоацетатом,* в результате чего образуется шестиуглеродная лимонная кислота, которая и дала название всему циклу. Далее в ходе семи последовательных ферментативных реакций два атома углерода удаляются в виде CO_2 и в конце концов регенерируется оксалоацетат. Каждый оборот цикла дает две молекулы CO_2, образующиеся из двух углеродных атомов, поступивших в предыдущие обороты цикла (рис. 7-14). Превращение ацетильной группы в составе ацетил-CoA можно представить следующей суммарной реакцией:

CH_3COOH (в виде ацетил-CoA) + $2H_2O$ + $3NAD^+$ + FAD, связанный с белком → $2CO_2$ + $3H^+$ + 3NADH + $FADH_2$, связанный с белком.

Кроме того, в результате этой реакции синтезируется одна молекула ATP (через GTP) путем *субстратного фосфорилирования,* подобно тому как это происходит при гликолизе (см. разд. 2.3.2).

Наиболее важный вклад цикла лимонной кислоты в метаболизм - это извлечение высокоэнергетических электронов, происходящее при окислении двух углеродных атомов в молекуле ацетил-CoA. Эти электроны связываются NADH и $FADH_2$ и затем быстро передаются в дыхательную цепь во внутренней митохондриальной мембране. $FADH_2$ - компонент сукцинатдегидрогеназного комплекса внутренней мембраны - передает свои электроны непосредственно в дыхательную цепь. В отличие от этого NADH образует растворимый пул восстанавливающих эквивалентов в матриксе и отдает свои электроны в результате случайных взаимодействий с мембраносвязанной дегидрогеназой. Рассмотрим теперь, каким образом энергия этих электронов используется для синтеза ATP.

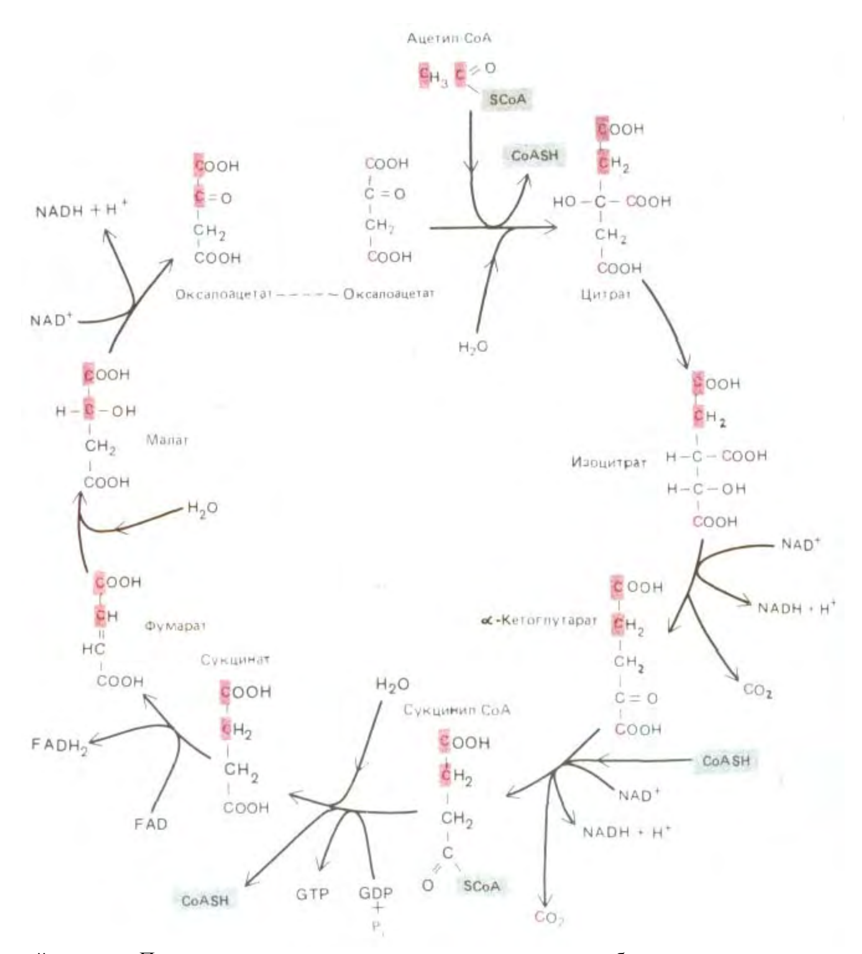


Рис.7-14. Цикл лимонной кислоты. Промежуточные продукты представлены в виде свободных жирных кислот, хотя в действительности карбоксильные группы ионизированы. Каждая из показанных реакций катализируется особым ферментом; все эти ферменты находятся в матриксе митохондрии. Два углеродных атома, приносимые с ацетил-CoA, превращаются в CO_2 в последующих оборотах цикла. Цветом выделены два углеродных атома, превращающиеся в CO_2 уже в данном цикле. Кроме того, образуются три молекулы NADH. Образующаяся молекула GTP может быть превращена в ATP путем обменной реакции GTP + ADP → GDP + ATP. Молекула $FADH_2$ остается в составе *сукцинатдегидрогеназного комплекса,* находящегося во внутренней мембране митохондрии; этот комплекс передает электроны с $FADH_2$ непосредственно на убихинон.

7.1.5. На митохондриальной мембране энергия окислительных реакций преобразуется в результате хемиосмотического процесса в энергию ATP [6]

Хотя цикл лимонной кислоты составляет часть аэробного метаболизма, ни в одной из реакций этого цикла, приводящих к образованию NADH и $FADH_2$, молекулярный кислород не принимает прямого участия; это происходит только в завершающей серии катаболических реакций, протекающих на внутренней мембране. Почти вся энергия, получаемая на ранних этапах окисления от сжигания углеводов, жиров и других питательных веществ, вначале запасается в форме высокоэнергетических электронов, переносимых NADH и FADH. Затем эти электроны взаимодействуют с молекулярным кислородом в дыхательной цепи. Так как большое количество высвобождаемой энергии используется ферментами внутренней мембраны для синтеза ATP из ADP и P_i, эти последние реакции называют **окислительным фосфорилированием** (рис. 7-15).

Как уже упоминалось, синтез ATP в реакциях окислительного фосфорилирования, протекающих в дыхательной цепи, зависит от хемиосмотического процесса. Механизм этого процесса, впервые предложенный в 1961 г., позволил разрешить проблему, давно стоявшую перед биологией клетки. Однако идея была настолько нова, что лишь через несколько лет она получила всеобщее признание в результате



Рис. 7-15. Основной итог превращения энергии, происходящего в митохондрии. В этом процессе, называемом *окислительным фосфорилированием,* внутренняя митохондриальная мембрана играет роль энергопреобразующего устройства, которое превращает часть энергии окисления NADH (и $FADH_2$) в энергию фосфатных связей ATP.

Таблица 7-1. Хемиосмотическое сопряжение

Хемиосмотическая гипотеза, предложенная в начале 60-х годов, включала четыре независимых постулата, касавшиеся функции митохондрий:

1. Митохондриальная дыхательная цепь, находящаяся во внутренней мембране, способна перемещать протоны; при прохождении электронов по дыхательной цепи происходит «откачивание» H^+ из матрикса.

2. Митохондриальный ATP-синтетазный комплекс тоже перемещает протоны через внутреннюю мембрану. Поскольку этот процесс обратим, фермент может не только использовать энергию гидролиза ATP для переноса H^+ через мембрану, но при достаточно большом протонном градиенте протоны начинают «течь» через ATP-синтетазу в обратном направлении, что сопровождается синтезом ATP.

3. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для H^+, OH" и вообще всех анионов и катионов.

4. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит ряд белков-переносчиков, осуществляющих транспорт необходимых метаболитов и неорганических ионов.

накопления экспериментальных данных. Раньше думали, что энергию для синтеза ATP в дыхательной цепи обеспечивает такой же механизм, как и при субстратном фосфорилировании: предполагалось, что энергия окисления используется для образования высокоэнергетической связи между фосфатной группой и каким-то промежуточным соединением и что превращение ADP в ATP осуществляется за счет энергии, выделяемой при разрыве этой связи. Однако, несмотря на интенсивные поиски, предполагаемый интермедиат не был обнаружен.

Согласно *хемиосмотической гипотезе,* вместо богатых энергией промежуточных продуктов существует прямая связь между процессами химическими («хеми...») и транспортными (осмотическими, от греческого osmos - толчок, давление) - **хемиосмотическое сопряжение** (табл. 7-1). При прохождении высокоэнергетических электронов, доставляемых NADH и $FADH_2$, по дыхательной цепи внутренней митохондриальной

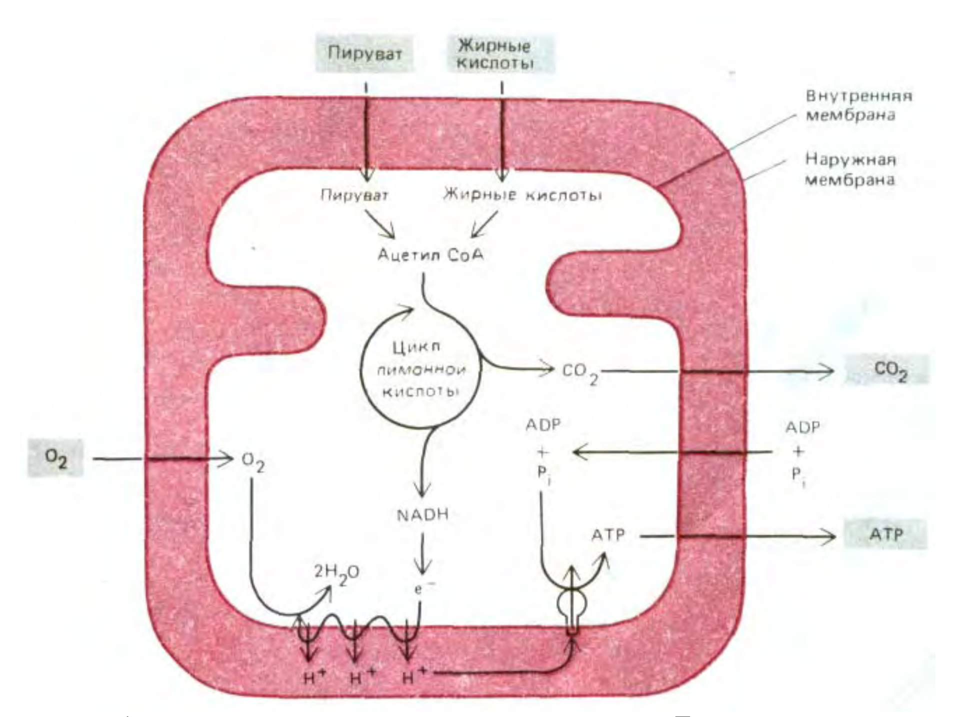


Рис. 7-16. Потоки важнейших метаболитов, поступающих в митохондрию и выходящих из нее. Пируват и жирные кислоты входят в митохондрию и метаболизируются в цикле лимонной кислоты, в котором образуется NADH. Затем в ходе окислительного фосфорилирования богатые энергией электроны NADH передаются на кислород с помощью дыхательной цепи, находящейся во внутренней мембране; при этом благодаря хемиосмотическому механизму образуется ATP.

NADH, образовавшийся в цитозоле при гликолизе, тоже передает свои электроны в дыхательную цепь (не показано). Так как NADH не способен проходить через внутреннюю мембрану, перенос его электронов осуществляется непрямым путем -при помощи одной из нескольких челночных систем, транспортирующих в митохондрию другое восстановленное соединение; после окисления это соединение возвращается в цитозоль, где вновь восстанавливается с помощью NADH.

мембраны от одного переносчика к следующему высвобождается энергия, которая используется для перекачивания протонов (H^+) через внутреннюю мембрану из матрикса в межмембранное пространство. В результате на внутренней мембране создается *электрохимический протонный градиент;* энергию обратного тока протонов «вниз» по этому градиенту использует связанный с мембраной фермент АТР-синтетаза, катализирующий образование АТР из ADP и P_i, т. е. завершающий этап окислительного фосфорилирования (рис. 7-16).

В оставшейся части этого раздела мы кратко рассмотрим тот тип реакций, который делает возможным окислительное фосфорилирование; детали будут обсуждаться позже (разд. 7.2).

7.1.6. Электроны переносятся с NADH на кислород с помощью трех больших ферментных комплексов дыхательной цепи [7]

Хотя механизмы извлечения энергии в дыхательной цепи и в других катаболических реакциях различны, в их основе лежат общие принципы. Реакция $H_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow H_2O$ разбита на много небольших «шагов», так что высвобождаемая энергия может переходить в связанные формы, а не рассеивается в виде тепла. Как и в случае образования АТР и NADH при гликолизе или в цикле лимонной кислоты, это связано с использованием непрямого пути. Но уникальность дыхательной цепи заключается в том, что здесь прежде всего атомы водорода расщепляются на электроны и протоны. Электроны передаются через серию переносчиков, встроенных во внутреннюю митохондриальную мембрану. Когда электроны достигают конца этой электронтранспортной цепи, протоны оказываются там же для нейтрализации отрицательного заряда, возникающего при переходе электронов на молекулу кислорода (рис. 7-17).

Проследим процесс окисления, начиная с образования NADH - главного акцептора реактивных электронов, извлекаемых при окислении молекул питательных веществ. Каждый атом водорода

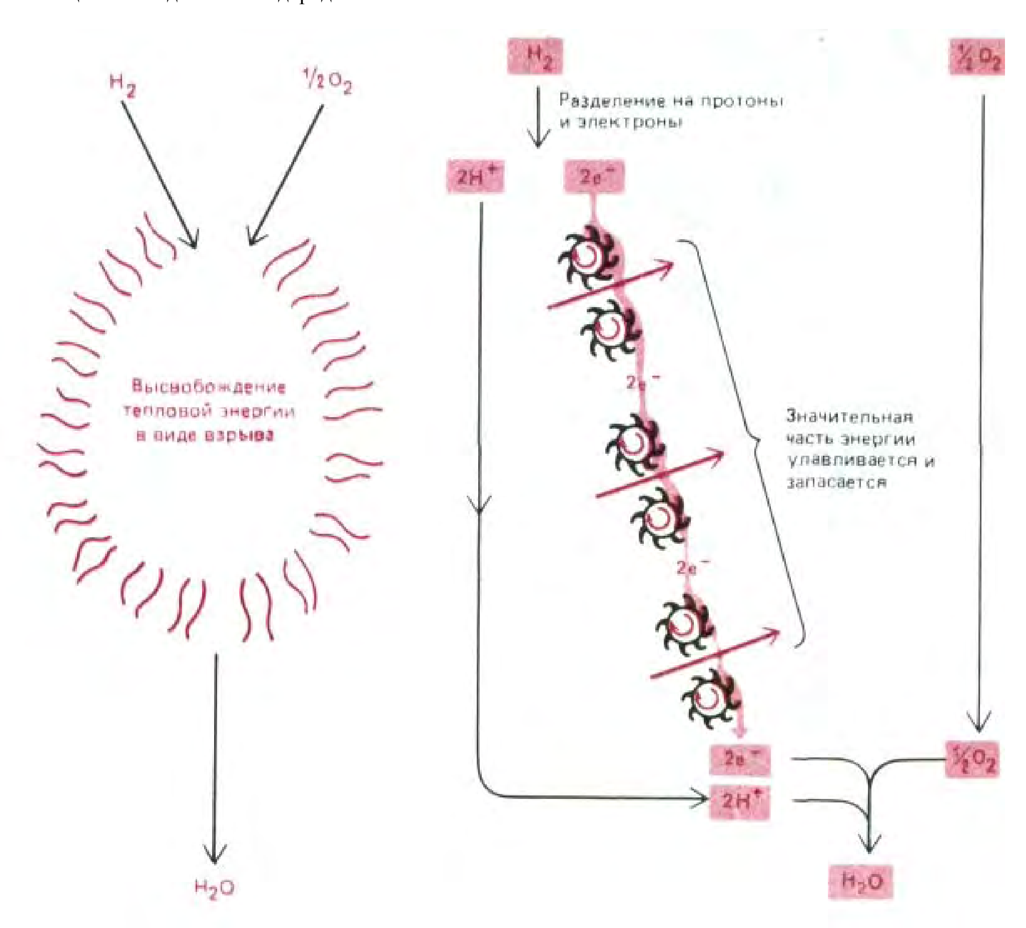


Рис. 7-17. Эти схемы показывают, каким образом большая часть энергии «сжигания» водорода не рассеивается в виде тепла *(слева), а* улавливается и запасается в полезной для клетки форме с помощью электронтранспортной цепи, находящейся во внутренней митохондриальной мембране *(справа).* Остаток энергии высвобождается митохондрией в форме тепла. В действительности изображенные здесь электроны и протоны отнимаются от атомов водорода, ковалентно связанных с молекулами NADH или $FADH_2$ (см. рис. 7-18).

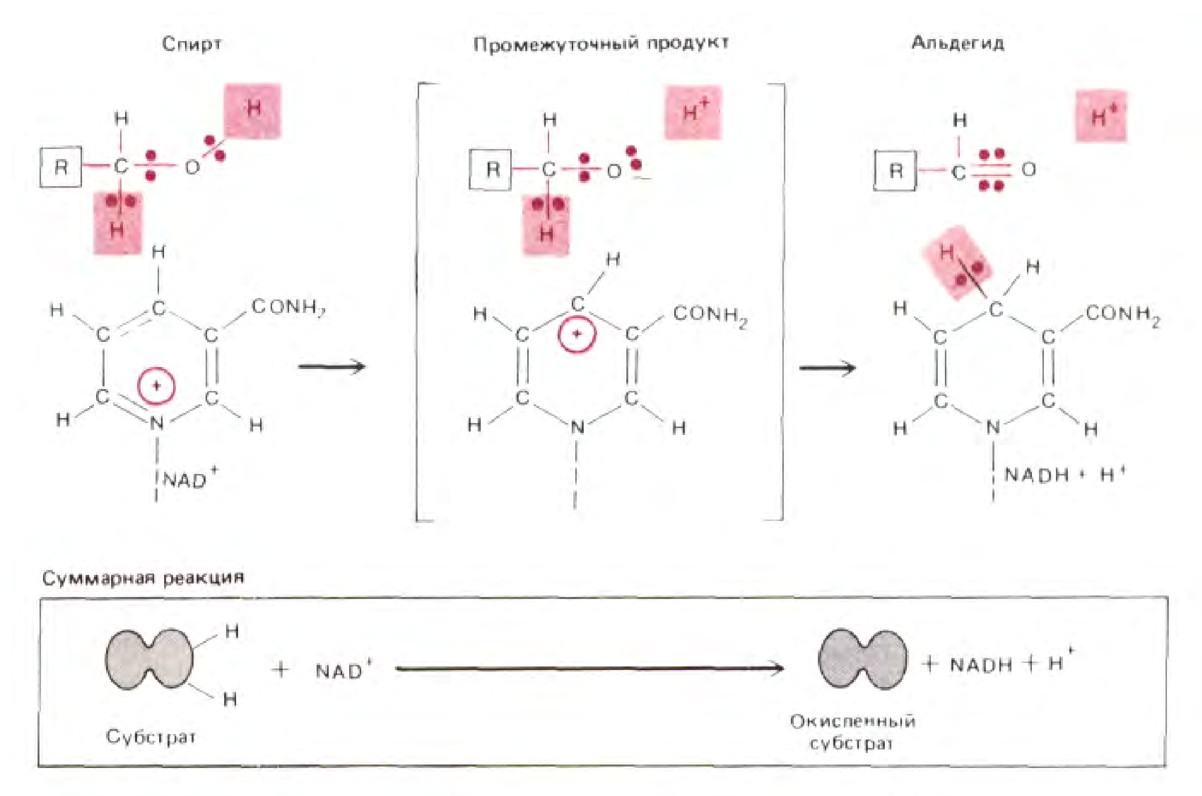


Рис. 7-18. Предполагаемый механизм биологического окисления спирта в альдегид. От молекулы спирта отщепляются компоненты двух полных атомов водорода, при этом гидрид-ион переносится на NAD^+ , а протон переходит в водную среду. Здесь представлены только никотинамидные кольца, входящие в состав NAD^+ и NADH (см. рис. 2-22). Показанные стадии процесса протекают на поверхности фермента алкогольдегидрогеназы (не показан) при участии его специфических групп. (С разрешения P. F. Cook, N.J. Oppenheimer, W. W. Cleland, Biochemistry, 20: 1817 1825, 1981. Copyright 1981, American Chem. Soc.)

(будем обозначать его H) состоит из одного электрона *(e^-)* и одного протона (H^+). Механизм присоединения электронов к NADH обсуждался раньше (разд. 2.3.4) и более детально представлен на рис. 7-18. Как ясно из этой схемы, каждая молекула NADH несет *гидрид-ион* (водородный атом плюс добавочный электрон, $H:^-$), а не просто атом водорода. Однако из-за присутствия в окружающем водном растворе свободных протонов перенос гидрид-иона в составе NADH эквивалентен переносу двух атомов водорода или молекулы водорода ($H:^- + H^+ \rightarrow H_2$).

Перенос электронов по дыхательной цепи начинается с отнятия гидрид-иона ($H:^-$) от NADH; при этом регенерируется NAD^+ , а гидрид-ион превращается в протон и два электрона ($H:^- \rightarrow H^+ + 2e^-$). Эти электроны переходят на первый из более чем 15 различных переносчиков электронов в дыхательной цепи. В этот момент электроны обладают очень большой энергией, запас которой постепенно уменьшается по мере прохождения их по цепи. Чаще всего электроны переходят от одного атома металла к другому, причем каждый из этих атомов прочно связан с белковой молекулой, которая влияет на его сродство к электрону. Разнообразные типы переносчиков электронов в дыхательной цепи будут подробно рассмотрены позднее (разд. 7.2.5). Важно отметить, что все белки - переносчики электронов - группируются в три больших *комплекса дыхательных ферментов,* каждый из которых содержит трансмембранные белки, прочно закрепляющие комплекс во внутренней мембране митохондрии (см. разд. 7.2.6). Каждый последующий комплекс обладает большим сродством к электронам, чем предыдущий. Электроны последовательно переходят с одного комплекса на другой, пока наконец не перейдут на кислород, имеющий наибольшее сродство к электрону.

7.1.7. Энергия, высвобождаемая в процессе переноса электронов по дыхательной цепи, запасается в форме электрохимического протонного градиента на внутренней мембране митохондрий [8]

Окислительное фосфорилирование возможно благодаря тесной ассоциации переносчиков электронов с белковыми молекулами. Белки

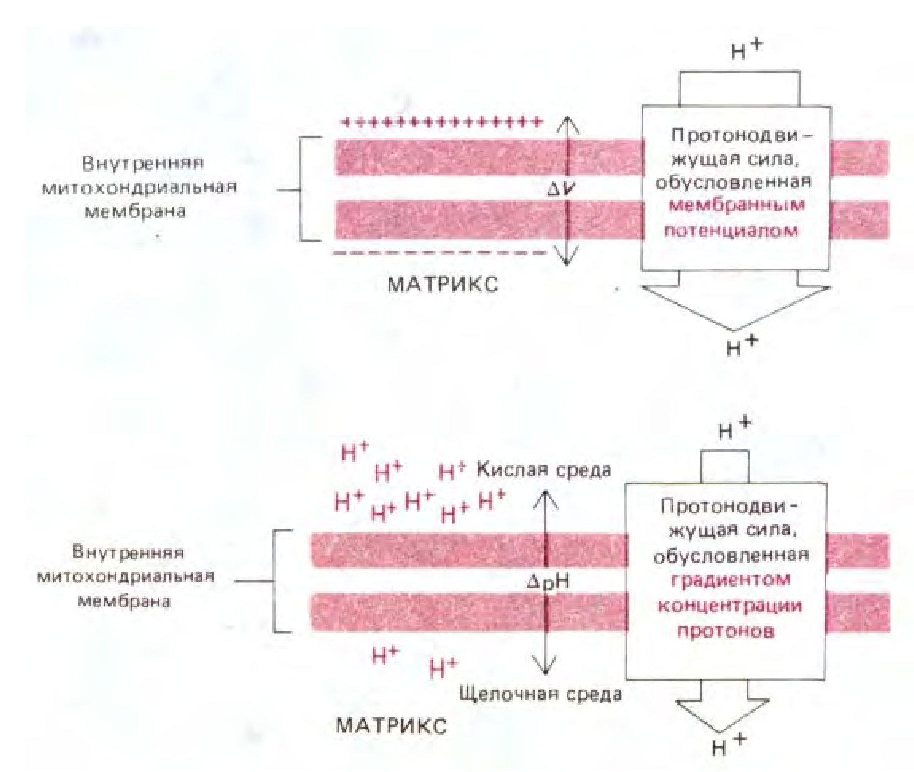


Рис. 7-19. Две составляющие электрохимического протонного градиента. Общая протонодвижущая сила, создающаяся на внутренней митохондриальной мембране, складывается из большой силы, обусловленной мембранным потенциалом (традиционно обозначается как Δψ, но в нашем тексте - как ΔV), и меньшей, которую создает градиент концентрации протонов (ΔpH). Обе силы стремятся перемещать протоны внутрь матрикса.

направляют электроны по дыхательной цепи так, что они последовательно переходят от одного ферментного комплекса к другому, не «перескакивая» через промежуточные звенья. Особенно важно то, что перенос электронов сопряжен с аллостерическими изменениями определенных белковых молекул, в результате чего энергетически выгодный поток электронов вызывает перекачивание протонов (H^+) через внутреннюю мембрану из матрикса в межмембранное пространство и далее за пределы митохондрии. Передвижение протонов приводит к двум важным следствиям: 1) между двумя сторонами внутренней мембраны создается градиент pH - в матриксе pH выше, чем в цитозоле, где значение pH обычно близко к 7,0 (так как малые молекулы свободно проходят через наружную мембрану митохондрии, pH в межмембранном пространстве будет таким же, как в цитозоле); 2) на внутренней мембране создается градиент напряжения (мембранный потенциал), причем внутренняя сторона мембраны заряжается отрицательно, а наружная - положительно.

Градиент pH (ΔpH) заставляет ионы H^+ переходить обратно в матрикс, а ионы OH^- из матрикса, что усиливает эффект мембранного потенциала (ΔV), под действием которого любой положительный заряд притягивается в матрикс, а любой отрицательный выталкивается из него. Совместное действие этих двух сил приводит к возникновению **электрохимического протонного градиента** (рис. 7-19).

Электрохимический протонный градиент создает **протонодвижущую силу,** измеряемую в милливольтах (мВ). Так как градиент pH (ΔpH) в 1 единицу pH эквивалентен мембранному потенциалу около 60 мВ, протонодвижущая сила будет равна ΔV — 60 (ΔpH). В типичной клетке эта сила на внутренней мембране дышащей митохондрии составляет около 220 мВ и складывается из мембранного потенциала примерно в 160 мВ и градиента pH, близкого к — 1 единице pH.

7.1.8. Энергия электрохимического протонного градиента используется для синтеза ATP и транспорта метаболитов и неорганических ионов в матрикс [9]

Внутренняя мембрана митохондрий отличается необычно высоким содержанием белка - в ней по весу примерно 70% белка и 30%

фосфолипидов. Многие из этих белков входят в состав электронтранспортной цепи, поддерживающей протонный градиент на мембране. Другой важный компонент - фермент *АТР-синтетаза,* катализирующий синтез АТР. Это большой белковый комплекс, через который протоны перетекают обратно в матрикс по электрохимическому градиенту. Подобно турбине, АТР-синтетаза преобразует одну форму энергии в другую, синтезируя АТР из ADP и P_i в митохондриальном матриксе в ходе реакции, сопряженной с током протонов в матрикс (рис. 7-20).

Но синтез АТР - это не единственный процесс, идущий за счет энергии электрохимического градиента. В матриксе, где находятся ферменты, участвующие в цикле лимонной кислоты и других метаболических реакциях, необходимо поддерживать высокие концентрации различных субстратов; в частности, для АТР-синтетазы требуются ADP и фосфат. Поэтому через внутреннюю мембрану должны транспортироваться разнообразные несущие заряд субстраты. Это достигается с помощью различных белков-переносчиков, встроенных в мембрану (см. разд. 6.4.4), многие из которых активно перекачивают определенные молекулы против их электрохимических градиентов, т. е. осуществляют процесс, требующий затраты энергии. Для большей части метаболитов источником этой энергии служит сопряжение с перемещением каких-то других молекул «вниз» по *их* электрохимическому градиенту (см. разд. 6.4.9). Например, в транспорте ADP участвует система антипорта ADP-ATP: при переходе каждой молекулы ADP в матрикс из него выходит по своему электрохимическому градиенту одна молекула АТР. В то же время система симпорта сопрягает переход фосфата внутрь митохондрии с направленным туда же потоком H^+ : протоны входят в матрикс по своему градиенту и при этом «тащат» за собой фосфат. Подобным образом переносится в матрикс и пируват (рис. 7-21). Энергия электрохимического протонного градиента используется также для переноса в матрикс ионов Ca^{2+} , которые, по-видимому, играют важную роль в регуляции активности некоторых митохондриальных ферментов; большое значение может иметь и поглощение митохондриями этих ионов для удаления их из цитозоля, когда концентрация Ca^{2+} в последнем становится опасно высокой (см. разд. 12.3.7).

Чем больше энергии электрохимического градиента затрачивается на перенос молекул и ионов в митохондрию, тем меньше остается для синтеза АТР. Например, если изолированные митохондрии поместить в среду с высоким содержанием Ca^{2+} , то они полностью прекратят синтез АТР; вся энергия градиента будет расходоваться на транспорт Ca^{2+} в матрикс. В некоторых специализированных клетках электрохимический протонный градиент «шунтируется» таким образом, что митохондрии вместо синтеза АТР образуют тепло (см. разд. 7.2.12). Очевидно, клетки способны регулировать использование энергии электрохимического протонного градиента и направлять ее на те процессы, которые наиболее важны в данный момент.

7.1.9. Быстрое превращение ADP в АТР в митохондриях позволяет поддерживать высокое отношение концентраций АТР/ADP в клетках [10]

С помощью особого белка, встроенного во внутреннюю мембрану, ADP транспортируется в матрикс в обмен на АТР по принципу антипорта (рис. 7-21). В результате молекулы ADP, высвобождаемые при гидролизе АТР в цитозоле, быстро поступают в митохондрию для «перезарядки», в то время как молекулы АТР, образующиеся в матриксе в процессе окислительного фосфорилирования, тоже быстро выходят в цитозоль, где они нужны. В организме человека молекулы АТР за

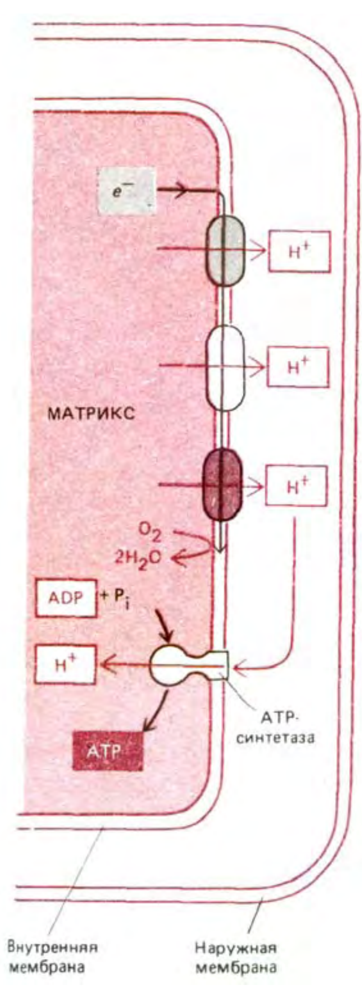


Рис. 7-20. Общий механизм окислительного фосфорилирования. По мере прохождения высокоэнергетических электронов по электрон-транспортной цепи некоторая часть высвобождаемой энергии используется для приведения в действие трех дыхательных ферментных комплексов, откачивающих протоны из матрикса. В результате этого на внутренней мембране создается электрохимический протонный градиент, под действием которого протоны возвращаются обратно в матрикс через АТР-синтетазу - трансмембранный белковый комплекс, использующий энергию протонного тока для синтеза в матриксе АТР из ADP и P_i.

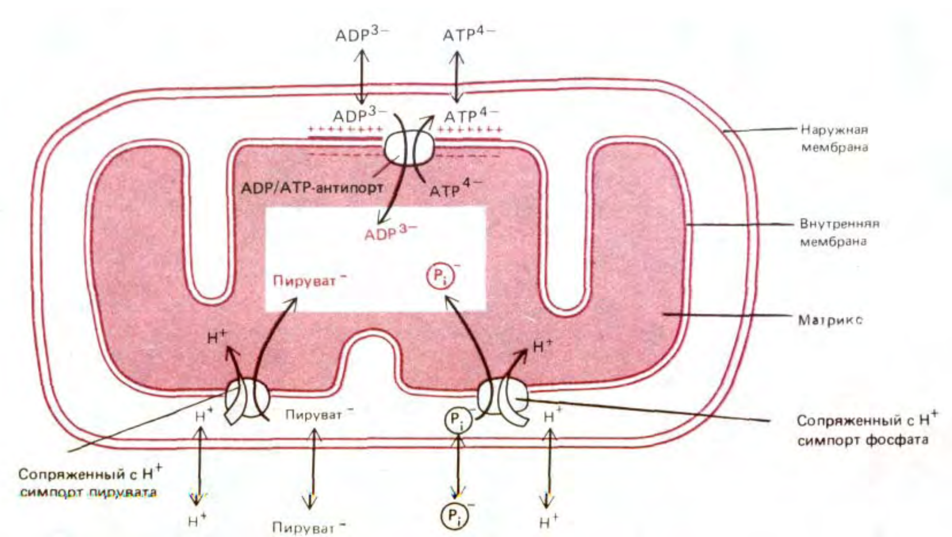


Рис. 7-21. Некоторые из процессов активного транспорта, идущих за счет энергии электрохимического протонного градиента, который поддерживается на внутренней мембране. Указан заряд каждой из транспортируемых молекул. Наружная мембрана свободно проницаема для всех этих соединений. Транспортные механизмы типа симпорта и антипорта подробно рассмотрены в гл. 6.

сутки оборачиваются несколько тысяч раз, что позволяет поддерживать в клетке концентрацию ATP, более чем в 10 раз превышающую концентрацию ADP.

Как уже говорилось в гл. 2, биосинтетические ферменты клетки направляют превращения своих субстратов по определенным метаболическим путям, часто осуществляя энергетически невыгодные реакции путем сопряжения их с энергетически выгодным гидролизом ATP (см. рис. 2-27). Таким образом, высококонцентрированный пул ATP обеспечивает внутриклеточные процессы энергией подобно аккумулятору, приводящему в действие электромотор: если митохондрии прекратят свою активность, то клеточная «аккумуляторная батарея» начнет разряжаться и наступит момент, когда энергетически невыгодные реакции уже не смогут осуществляться за счет гидролиза ATP.

На первый взгляд может показаться, что такого состояния не будет до тех пор, пока концентрация ATP не упадет до нуля. Фактически же это состояние наступает значительно раньше - при определенном уровне ATP, зависящем от концентраций ADP и P_i. Для того чтобы объяснить, почему так происходит, нужно обратиться к некоторым элементарным принципам термодинамики.

7.1.10. Разница между $\Delta G°$ и ΔG. Для того чтобы клетка могла использовать гидролиз ATP, необходима большая отрицательная величина ΔG [11]

Согласно второму закону термодинамики, химические реакции протекают спонтанно только в направлении, повышающем «неупорядоченность» во Вселенной. В гл. 2 говорилось о том, что реакции, при которых высвобождаемая энергия рассеивается в виде тепла в окружающую среду (такие, как гидролиз ATP), способствуют увеличению этой неупорядоченности, так как усиливают хаотическое движение молекул. Кроме того, химические реакции могут влиять на степень неупорядоченности, изменяя концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции. Суммарное изменение неупорядоченности Вселенной в результате какой-либо реакции определяется **изменением свободной энергии,** ΔG, сопровождающим эту реакцию: чем больше уменьшается свободная энергия (т. е. больше отрицательное значение ΔG), тем в большей

1\. АТР $\xrightarrow{\text{гидролиз}}$ ADP + P_i

Скорость гидролиза = (константа скорости гидролиза) · (концентрация ATP)

2\. ADP + P_i $\xrightarrow{\text{синтез}}$ ATP

Скорость синтеза = (константа скорости синтеза) · (концентрация фосфата) · (концентрация ADP)

3\. При равновесии: скорость синтеза = скорость гидролиза

(константа скорости синтеза) · (концентрация фосфата) · (концентрация ADP) = (константа скорости гидролиза) · (концентрация ATP)

$$\frac{(\text{концентрация ADP}) \cdot (\text{концентрация фосфата})}{\text{концентрация ATP}} = \frac{(\text{константа скорости гидролиза})}{(\text{константа скорости синтеза})} = \text{Константа равновесия } K$$

$$\frac{|ADP| \cdot |P_i|}{|ATP|} = K$$

4\. Для реакции

ATP ⟶ ADP + P_i

справедливо следующее уравнение:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[ADP] \cdot [P_i]}{[ATP]};$$

где ΔG и ΔG^0 выражены в килокалориях на моль, R — газовая постоянная ($2 \cdot 10^{-3}$ ккал · моль$^{-1}$ $^0K^{-1}$), T — абсолютная температура (^0K); все концентрации выражены в молях на литр. Если концентрации всех реагирующих веществ равны 1М, то $\Delta G = G^0$ (так как $RT \ln 1 = 0$). Таким образом, ΔG^0 является величиной постоянной и определяется как изменение стандартной свободной энергии для данной реакции.

Реакция, находящаяся в состоянии равновесия, не оказывает влияния на неупорядоченность во Вселенной, т. е. $\Delta G = 0$. Поэтому при равновесии

$$-RT \ln \frac{|ADP| \cdot |P_i|}{|ATP|} = \Delta G^0.$$

Но концентрации реагирующих веществ при равновесии должны удовлетворять уравнению равновесия

$$\frac{[ADP] \cdot [P_i]}{[ATP]} = K.$$

Следовательно, при равновесии

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

Итак, если ΔG^0 определяет равновесное состояние реакции, то ΔG показывает, *насколько* реакция смещена от равновесия

Рис. 7-22. Принципиальная связь между изменениями свободной энергии и равновесием реакции иллюстрируется здесь на примере гидролиза АТР. Приводимая константа равновесия К выражена в литрах на моль. (Вопрос о свободной энергии иллюстрируется на схеме 2-7, с. 96-97; определение константы равновесия дано на рис. 3-7).

степени возрастает неупорядоченность Вселенной и тем легче протекает реакция (см. схему 2-7).

Величина изменения свободной энергии для гидролиза АТР с образованием ADP и неорганического фосфата при условиях, обычно существующих в клетке, варьирует в пределах от — 11 до — 13 ккал/моль. Однако столь благоприятные условия для протекания этой реакции связаны с тем, что концентрация АТР в клетке поддерживается на очень высоком уровне по сравнению с концентрациями ADP и P_i. При так называемых «стандартных условиях», когда концентрации АТР, ADP и P_i одинаковы и равны 1 моль/л, величину *ΔG* для гидролиза АТР называют **изменением стандартной свободной энергии** для данной реакции, ΔG°; она составляет — 7,3 ккал/моль. При какой-то еще более низкой концентрации АТР по сравнению с ADP и P_i величина ΔG упадет до нуля. В этом случае скорость образования АТР из ADP и P_i будет равна скорости гидролиза АТР; иными словами, при ΔG = 0 реакция находится в состоянии равновесия (рис. 7-22).

При постоянной температуре величина ΔG° постоянна и зависит только от *природы* реагирующих веществ, тогда как ΔG изменяется при изменении *концентраций* реагирующих веществ и указывает, насколько данная реакция далека от равновесия. Поэтому именно ΔG, а не ΔG° определяет, может ли данная реакция служить источником энергии для других реакций. Высокая концентрация АТР в клетке (относительно ADP и P_i) при активном синтезе этого вещества в митохондриях обусловливает большую отрицательную величину ΔG для реакции гидролиза АТР и удерживает эту реакцию в состоянии, далеком от равновесия. В противном случае гидролиз АТР не мог бы использоваться клеткой для осуществления других процессов и многие биосинтетические реакции пошли бы в обратном направлении.

7.1.11. Клеточное дыхание необычайно эффективно

В процессе окислительного фосфорилирования каждая пара электронов NADH обеспечивает энергией образование примерно трех молекул АТР. Пара электронов $FADH_2$, обладающая меньшей энергией, дает энергию для синтеза только двух молекул АТР. В среднем каждая молекула ацетил-СоА, поступающая в цикл лимонной кислоты, дает около 12 молекул АТР. Это означает, что при окислении одной молекулы глюкозы образуются 24 молекулы АТР, а при окислении одной молекулы пальмитата - жирной кислоты с 16 углеродными атомами - 96 молекул АТР. Если учесть также экзотермические реакции, предшествующие образованию ацетил-СоА, окажется, что полное окисление одной молекулы глюкозы дает около 36 молекул АТР, тогда как при полном окислении пальмитата образуется примерно 129 молекул АТР. Это максимальные величины, так как фактически количество синтезируемого в митохондриях АТР зависит от того, какая доля энергии протонного градиента идет на синтез АТР, а не на другие процессы.

Если сравнить изменение свободной энергии при сгорании жиром и углеводов прямо до CO_2 и H_2O с общим количеством энергии запасаемой в фосфатных связях АТР в процессах биологического окисления, окажется, что эффективность преобразования энергии окисления в энергию АТР часто превышает 50%. Это значительно выше эффективности большинства энергопреобразующих устройств, созданных человеком. Если бы клетка работала с эффективностью (к.п.д) электромотора или автомобильного двигателя (10-20%), то организму для поддержания жизни требовалось бы намного больше пищи. Кроме того, поскольку вся неиспользованная энергия высвобождается в виде тепла, крупные организмы нуждались бы в более эффективных способах отвода тепла в окружающую среду.

Изучая клеточное дыхание, студенты иногда удивляются, почему химические взаимопревращения в клетке идут таким сложным путем. Казалось бы, вполне можно обойтись без цикла лимонной кислоты и многих звеньев дыхательной цепи и окислять сахара до CO_2 и H_2O более прямым способом. Но, хотя в этом случае ход процессов дыхания было бы легче запомнить, для клетки подобный путь оказался бы катастрофическим. Огромное количество свободной энергии, высвобождаемое при окислении, может эффективно использоваться только мелкими порциями. В сложном процессе окисления участвует много промежуточных продуктов, каждый из которых лишь незначительно отличается от предыдущего. Благодаря этому высвобождаемая энергия дробится на меньшие количества, которые можно эффективно преобразовывать с помощью сопряженных реакций в высокоэнергетические связи молекул АТР и NADH (см. рис. 2-17).

Заключение

Митохондрии осуществляют большую часть клеточных процессов окисления и производят почти весь АТР животной клетки. Митохондриальный матрикс содержит множество разнообразных ферментов, в том числе ферменты, окисляющие пируват и жирные кислоты до ацетил-СоА, и ферменты, окисляющие этот ацетил-СоА до CO_2 в цикле. лимонной кислоты. В ходе этих реакций окисления образуются большие количества NADH (и $FADH_2$). Энергия, получаемая при соединении кислорода с переносимыми NADH и $FADH_2$ реакционноспособными электронами, используется электронтранспортной цепью, находящейся во внутренней мембране митохондрии и называемой дыхательной цепью. Дыхательная цепь «откачивает» протоны из матрикса, что приводит

к созданию трансмембранного электрохимического протонного градиента, слагающегося из мембранного потенциала и разности pH. Энергия трансмембранного градиента в свою очередь используется для синтеза ATP и для активного транспорта необходимых метаболитов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Сочетание этих реакций обеспечивает эффективный обмен ATP-ADP между митохондрией и цитозолем, что позволяет поддерживать в клетке высокий уровень ATP.

7.2. Дыхательная цепь и ATP-синтетаза [12]

Ознакомившись в общих чертах с функцией митохондрий, перейдем теперь к более детальному рассмотрению цепи дыхания - электрон-транспортной цепи, имеющей столь важное значение для окислительного метаболизма в целом. Большинство элементов этой цепи составляет неотъемлемую часть внутренней митохондриальной мембраны и может служить одним из самых ярких примеров сложного взаимодействия между отдельными белками биологической мембраны.

7.2.1. Из митохондрий можно выделить функционально активные частицы, «вывернутые наизнанку» [13]

В интактных митохондриях дыхательная цепь относительно недоступна для экспериментального анализа. Однако путем обработки митохондрий ультразвуком можно получить функционально активные *субмитохондриальные частицы* - обрывки крист, замкнувшиеся в маленькие пузырьки около 100 нм в диаметре (рис. 7-23). При использовании метода негативного контрастирования на электронных микрофотографиях субмитохондриальных частиц видно, что их наружная поверхность усеяна крошечными шариками, прикрепленными к мембране с помощью «ножки» (рис. 7-24). В интактных митохондриях эти грибовидные структуры локализованы на *внутренней* (обращенной к матриксу) стороне внутренней мембраны. Таким образом, субмитохондриальные частицы представляют собой как бы вывернутые наизнанку фрагменты внутренней мембраны: поверхности их, ранее обращенные к матриксу, обращены теперь к окружающей среде. В результате на них легко воздействовать теми не проходящими через мембрану веществами, которые в обычных условиях находились в матриксе. При добавлении NADH, ADP и неорганического фосфата эти частицы осуществляют перенос электронов с NADH на O_2, сопрягая это окисление с синтезом ATP. Такая бесклеточная система дает возможность выделять в функционально активной форме многочисленные белки, ответственные за окислительное фосфорилирование.

7.2.2. ATP-синтетазу можно выделить и снова встроить в мембрану в активной форме [14]

В 1960 г. было впервые показано, что различные мембранные белки, участвующие в окислительном фосфорилировании, могут быть выделены без потери активности. От поверхности субмитохондриальных частиц удалось отделить и перевести в растворимую форму усеивающие их крошечные белковые структуры. Хотя субмитохондриальные частицы без этих сферических структур продолжали окислять NADH в присутствии кислорода, синтеза ATP при этом не происходило. С другой стороны, выделенные структуры действовали как ATPазы, гидролизуя ATP до ADP и P_i. Когда сферические структуры (названные F_1 –

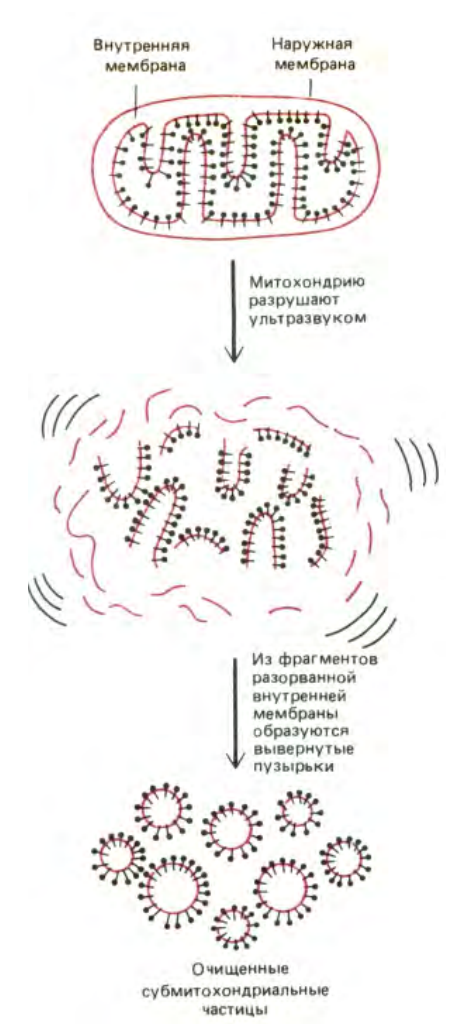


Рис. 7-23. Методика получения субмитохондриальных частиц из митохондрий. Частицы представляют собой обрывки разрушенных крист, образовавшие замкнутые пузырьки.

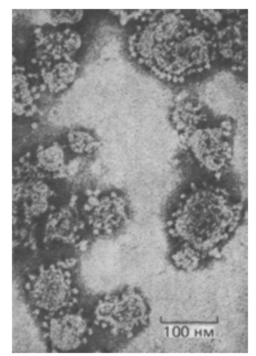


Рис. 7-24. Электронная микрофотография субмитохондриальных частиц. (С любезного разрешения Efraim Racker.)

ATPазами) добавляли к лишенным их субмитохондриальным частицам, реконструированные частицы вновь синтезировали ATP из ADP и P_i,

Впоследствии было показано, что F_1-ATPаза - это часть большого, пронизывающего всю толщу мембраны комплекса (массой около 500000 дальтон), который состоит но меньшей мере из девяти различных полипептидных цепей. Этот комплекс получил название **ATP-синтетазы** (или F_0F_1-ATPазы); он составляет около 15% всего белка внутренней митохондриальной мембраны. Весьма сходные ATP-синтетазы имеются в мембранах хлоропластов и бактерий. Такой белковый комплекс содержит трансмембранные каналы для протонов, и синтез ATP происходит только тогда, когда через эти каналы проходят протоны вниз по своему электрохимическому градиенту.

В экспериментах, проведенных в 1974 г., было очень наглядно показано, как работает ATP-синтетаза. К тому времени уже были разработаны методы введения интегральных мембранных белков, предварительно солюбилизированных с помощью детергента, в липидные пузырьки (липосомы), приготовленные из очищенных фосфолипидов (см. разд. 6.1.2). Это позволило создать «гибридную» мембрану, которая одновременно содержала очищенную митохондриальную ATP-синтетазу и бактериородопсин, выполняющий у бактерий функцию светозависимого протонного насоса (см. разд. 6.2.7). При освещении таких пузырьков протоны, накачиваемые внутрь бактериородопсином, выходили наружу через ATP-синтетазу, и в результате в окружающем растворе накапливался ATP (рис. 7-25). Так как прямое взаимодействие между бактериальным протонным насосом и ATP-синтетазой млекопитающих вряд ли возможно, этот эксперимент указывает на то, что и в митохондриях активный перенос протонов и синтез ATP - это, по всей вероятности, два раздельных процесса в общем механизме окислительного фосфорилирования.

7.2.3. ATP-синтетаза может действовать в обратном направлении - расщеплять ATP и перекачивать протоны [16]

Действие ATP-синтетазы обратимо: она способна использовать как энергию гидролиза ATP для перекачивания протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, так и энергию потока протонов по электрохимическому градиенту для синтеза ATP (рис. 7-26). Таким образом, ATP-синтетаза - это *обратимая сопрягающая система,* которая осуществляет взаимопревращение энергии электрохимического протонного градиента и химических связей. Направление ее работы зависит от соотношения между крутизной протонного градиента и локальной величиной ΔG для гидролиза ATP.

ATP-синтетаза получила свое название в связи с тем, что в обычных условиях протонного градиента, поддерживаемого дыхательной цепью (см. рис. 7-20), синтезирует большую часть всего ATP клетки. Число протонов, необходимое для синтеза одной молекулы ATP, в точности не известно. Для упрощения приводимых ниже расчетов мы будем предполагать, что при прохождении через ATP-синтетазу каждых трех протонов синтезируется одна молекула ATP.

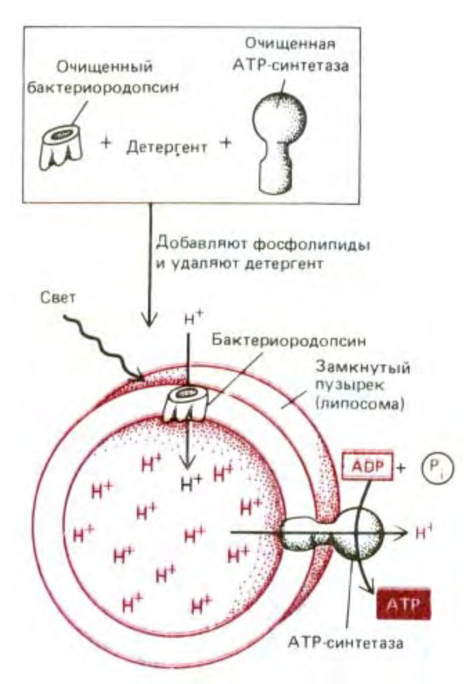


Рис. 7-25. Схема важного эксперимента, который показал, что ATP-синтетазу можно привести в действие простым током протонов. Путем сочетания светозависимого бактериального протонного насоса (бактериородопсина), ATP-синтетазы, выделенной из митохондрий бычьего сердца, и фосфолипидов были получены липосомы, синтезирующие при воздействии света ATP.

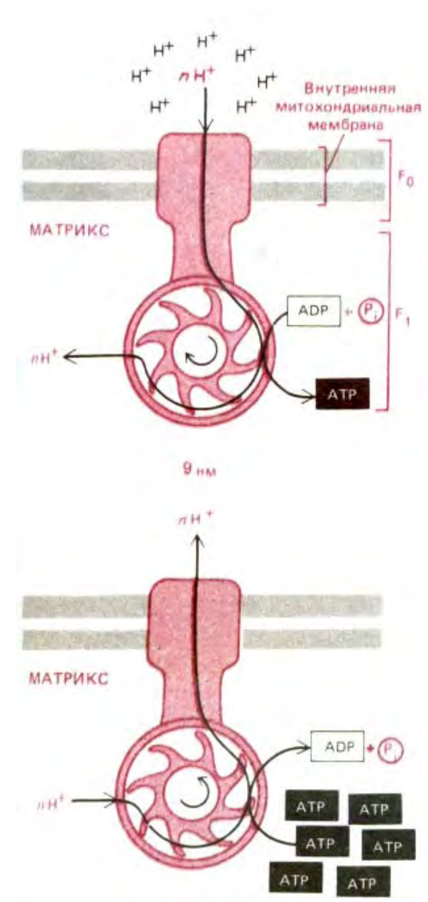


Рис. 7-26. АТР-синтетаза представляет собой обратимое сопрягающее устройство для взаимопревращения энергии электрохимического протонного градиента и энергии химических связей. Она известна также как F_0F_1-АТРаза и состоит по меньшей мере из девяти различных полипептидных цепей. Пять из этих цепей образуют сферическую головку комплекса, называемую F_1-АТРазой. АТР-синтетаза способна либо синтезировть АТР за счет энергии протондвижущей силы *(вверху),* либо перекачивать протоны против электрохимического градиента за счет гидролиза АТР *(внизу).* Как объяснено в тексте, направление действия фермента в любой данный момент зависит от суммарного изменения свободной энергии для сопряженных процессов - для перемещения протонов через мембрану и для синтеза АТР из ADP и P_i.

Ранее мы уже показали, что свободная энергия гидролиза АТР зависит от концентрации трех реагирующих веществ - АТР, ADP и P_i (см. рис. 7-22). ΔG для синтеза АТР - это та же величина, взятая с минусом. Свободная энергия перемещения протонов через мембрану равна сумме (1) ΔG для перемещения одного моля любых ионов между областями с разностью потенциалов ΔV и (2) ΔG для перемещения моля любых молекул между областями с различной их концентрацией. Уравнение для протондвижущей силы, приведенное в разд. 7.1.7, объединяет те же самые составляющие, но только разность концентраций заменена эквивалентным ей приращением мембранного потенциала, так что получается выражение для «электрохимического потенциала» протона. Таким образом, ΔG для перемещения протонов и протондвижущая сила учитывают один и тот же потенциал, только в первом случае он измеряется в килокалориях, а во втором - в милливольтах. Коэффициентом для перевода из одних единиц в другие служит число Фарадея. Таким образом, ΔG_H^+ = -0,023 (протондвижущая сила), где ΔG_H + выражается в килокалориях на 1 моль (ккал/моль), а протондвижущая сила - в милливольтах (мВ). Если электрохимический протонный градиент равен 220 мВ, то ΔG_H^+ = 5,06 ккал/моль.

Как будет работать в данный момент АТР-синтетаза - в направлении синтеза или гидролиза АТР, - зависит от точного баланса между изменениями свободной энергии для прохождения трех протонов через мембрану в матрикс (ΔG_{3H+} меньше нуля) и для синтеза АТР в матриксе ($\Delta G_{СИНТ.\ ATP}$ больше нуля). Как уже говорилось, величина $\Delta G_{СИНТ.\ ATP}$ определяется концентрациями трех веществ в матриксе митохондрии - АТР, ADP и P_i (см. рис. 7-22). С другой стороны, величина ΔG_{3H+} будет пропорциональна протондвижущей силе на внутренней мембране. Приводимый ниже пример поможет понять, каким образом соотношение между этими двумя изменениями свободной энергии влияет на работу АТР-синтетазы.

Как объяснено в подписи к рис. 7-26, переход одного протона в матрикс по электрохимическому градиенту, равному 220 мВ, высвобождает 5,06 ккал/моль, а переход трех протонов - в три раза больше энергии ($\Delta G_{3H\ +}$ = -15,2 ккал/моль). Таким образом, при постоянной протондвижущей силе (220 мВ) АТР-синтетаза будет синтезировать АТР до тех пор, пока отношение АТР к ADP и P_i не достигнет такого значения, при котором величина $\Delta G_{СИНТ.\ ATP}$ станет в точности равна + 15,2 ккал/моль (при этом $\Delta G_{СИНТ.\ ATP} + \Delta G_{3H\ +} = 0$). При таких условиях синтез АТР будет точно уравновешиваться его гидролизом.

Предположим, что в связи с реакциями, требующими затраты энергии, в цитозоле внезапно гидролизовалось большое количество АТР, и это привело к падению отношения АТР: ADP в матриксе митохондрии. В этом случае $\Delta G_{СИНТ.\ ATP}$ понизится (см. рис. 7-22) и АТР-синтетаза вновь переключится на синтез АТР, пока не восстановится исходное отношение АТР: ADP. Если же протондвижущая сила внезапно снизится и будет поддерживаться на постоянном уровне 200 мВ, то ΔG_{3H}^+ уменьшится до —13,8 ккал/моль. В результате

АТР-синтетаза начнет расщеплять АТР, и эта реакция будет продолжаться до тех пор, пока соотношение между концентрациями АТР и ADP не достигнет какого-то нового значения (при котором $\Delta G_{синт.АТР}$ — +13,8 ккал/моль), и так далее.

Как мы увидим позже, у многих бактерий АТР-синтетаза обращает свое действие при каждом переходе от аэробного метаболизма к анаэробному и обратно. Подобная обратимость свойственна и другим мембранным ферментам, сопрягающим перенос ионов с синтезом или гидролизом АТР. Например, натрий-калиевый й кальциевый насосы (второй из них описан в гл. 6) гидролизуют АТР и используют высвобождаемую энергию для перекачки через мембрану определенных ионов (см. разд. 6.4.5). Если любой из этих насосов заставить работать в условиях необычно крутого градиента транспортируемых ионов, то он будет действовать в обратном направлении - синтезировать АТР из ADP и P_i, вместо того чтобы осуществлять гидролиз АТР. Таким образом, подобно АТР-синтетазе, эти насосы способны преобразовывать энергию, запасаемую в трансмембранном ионном градиенте, непосредственно в энергию фосфатных связей АТР.

7.2.4. Дыхательная цепь переносит ионы H^+ через внутреннюю митохондриальную мембрану [16]

Если АТР-синтетаза в норме не транспортирует H^+ из матрикса, то дыхательная цепь, находящаяся во внутренней митохондриальной мембране, при нормальных условиях переносит через эту мембрану протоны, создавая таким образом электрохимический протонный градиент, доставляющий энергию для синтеза АТР. При определенных условиях можно экспериментально продемонстрировать способность дыхательной цепи откачивать протоны из матрикса. Можно, например, обеспечить взвесь изолированных митохондрий подходящим субстратом для окисления, а поток протонов через АТР-синтетазу блокировать. В анаэробных условиях небольшая добавка кислорода к такому препарату вызовет вспышку дыхательной активности, которая будет длиться одну-две секунды - пока весь кислород не израсходуется. Во время такой вспышки дыхания с помощью чувствительного pH-электрода можно зарегистрировать внезапное подкисление среды в результате выталкивания ионов H^+ из матрикса митохондрий.

Сходный эксперимент можно провести и на взвеси субмитохондриальных частиц. В этом случае при продувании кислорода среда будет подщелачиваться, так как мембрана здесь «вывернута наизнанку» и потому протоны будут накачиваться внутрь частиц.

7.2.5. Многие переносчики электронов могут быть идентифицированы с помощью методов спектроскопии [17] ,

Большинство переносчиков электронов, входящих в состав дыхательной цепи, поглощают свет, и их окисление или восстановление сопровождается изменением цвета. Обычно спектр поглощения и реакционноспособность каждого переносчика достаточно характерны, что позволяет даже в неочищенном экстракте прослеживать изменения его состояний с помощью спектроскопии. Это дало возможность выделить такие переносчики задолго до того, как стала понятна их истинная функция. Например, *цитохромы* были открыты в 1925 г. как соединения, которые быстро окисляются и восстанавливаются у таких различных организмов, как дрожжи, бактерии и насекомые. Наблюдая клетки и ткани с помощью спектроскопа, удалось идентифицировать три типа

цитохромов, которые различались по спектрам поглощения и были названы цитохромами а, *b* и с. Эта номенклатура сохранилась до сих пор, хотя сейчас известно, что клетки содержат несколько видов цитохромов каждого типа, и классификация по типам не отражает их функцию.

Цитохромы образуют семейство окрашенных белков, объединяемых наличием в их молекуле связанной группы *гема;* принимая один электрон, атом железа, входящий в состав гема, восстанавливается - переходит из состояния Fe III в состояние Fe II. Гем содержит *порфириновое* кольцо и атом железа, прочно связанный с помощью четырех азотных атомов, расположенных в углах квадрата (рис. 7-27). Близкие по строению порфириновые кольца определяют красный цвет крови и зеленый цвет листьев, связывая железо в гемоглобине (разд. 10.5.3) и магний в хлорофилле (разд. 7.3.6). Из множества белков дыхательной цепи лучше всего изучен цитохром *с*; его трехмерная структура была определена методом рентгеноструктурного анализа (рис. 7-28).

Железо-серные белки образуют вторую важную группу переносчиков электронов. В молекулах этих белков два или четыре атома железа связаны с тем же числом атомов серы и с боковыми цепями цистеина, образуя **железо-серный центр** белка (рис. 7-29). Железо-серных центров в дыхательной цепи больше, чем цитохромов, но для их выявления нужны методы электронного спинового резонанса (ЭСР), поэтому железо-серные центры менее изучены.

Самый простой переносчик электронов представляет собой небольшую гидрофобную молекулу, растворенную в липидном бислое и называемую *убихиноном* или *коферментом Q*. Он способен принять или отдать как один, так и два электрона и временно захватывает из среды протон при переносе каждого электрона (рис. 7-30).

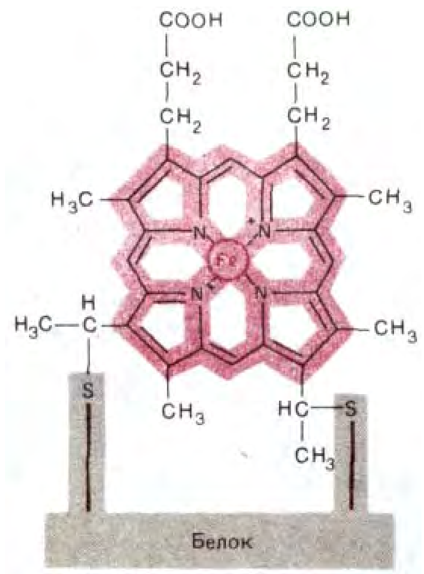


Рис. 7-27. Строение гема, ковалентно связанного с цитохромом *с*. Четыре из шести координационных положений железа заняты порфириновым кольцом. Пятое и шестое координационные положения ориентированы перпендикулярно к плоскости кольца. Почти во всех цитохромах эти два положения заняты боковыми цепями аминокислот, что не позволяет связывать здесь другие лиганды. Исключением служит цитохром a_3; так же как в гемоглобине и миоглобине, шестое координационное положение железа в этом компоненте цитохромоксидазы свободно и потому может связывать кислород.

В дыхательной цепи имеется пять различных цитохромов. Поскольку гемы, входящие в состав разных цитохромов, несколько различаются по своему строению и не одинаковым образом связаны с соответствующими белками, не одинаково и их сродство к электронам.

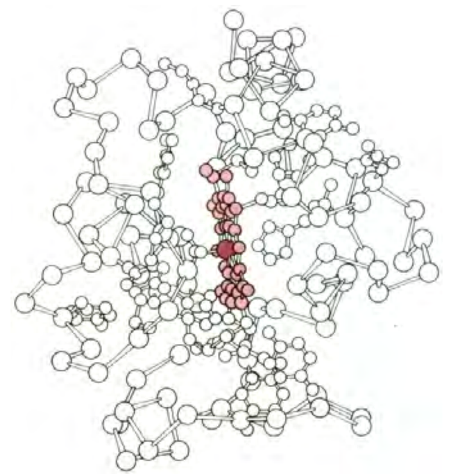


Рис. 7-28. Трехмерная модель цитохрома *с* - одного из переносчиков электронов в дыхательной цепи. Этот небольшой белок, содержащий немногим больше 100 аминокислотных остатков, может перемещаться в мембране, так как связан лишь ионными взаимодействиями (см. рис. 7-35). Атом железа (выделен более темным цветом) в составе связанного гема (окрашенного слабее) способен переносить один электрон (см. также рис. 3-52, *А)*.

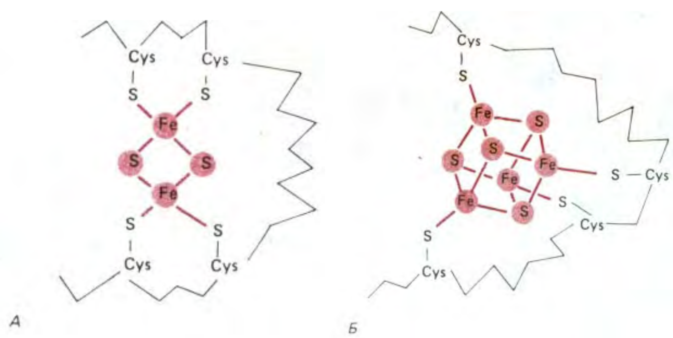


Рис. 7-29. Строение железо-серных центров двух типов. *А.* Центр типа 2Fe2S. *Б.* Центр типа 4Fe4S. Хотя в состав центра входят несколько атомов железа, каждый из центров способен переносить за один раз только один электрон. В дыхательной цепи имеется более шести различных железо-серных центров.

Помимо шести различных гемов в молекулах цитохромов, более чем шести железо-серных центров и убихинона, имеются еще два атома меди и флавин, служащие переносчиками электронов и прочно связанные с белками дыхательной цепи на всем пути от NADH до кислорода. Путь переноса электронов включает всего около 40 различных белков. Порядок расположения различных переносчиков в дыхательной цепи был определен с помощью сложных спектроскопических измерений (рис. 7-31), и вначале многие белки были выделены и описаны как отдельные полипептиды. Однако истинное понимание функции дыхательной цепи пришло позднее, когда выяснилось, что белки организованы в три больших ферментных комплекса.

7.2.6. Дыхательная цепь содержит три больших ферментных комплекса, встроенных во внутреннюю мембрану [18]

Мембранные белки трудно выделить в виде интактных комплексов, так как они нерастворимы в большинстве водных растворов, а такие вещества, как детергенты и мочевина, необходимые для их солюбилизации, могут нарушать нормальное белок-белковое взаимодействие (разд. 6.2.2). Однако в начале 1960-х гг. было обнаружено, что с помощью относительно мягких ионных детергентов, таких как дезоксихолат (рис. 7-32), можно солюбилизировать некоторые компоненты митохондриальной внутренней мембраны в нативной форме. Это позволило идентифицировать и выделить три главных связанных с мембраной комплекса дыхательных ферментов на пути от NADH до кислорода (рис. 7-33).

1. NADH-дегидрогеназный комплекс самый большой из дыхательных ферментных комплексов - имеет мол. массу свыше 800000 и содержит более 22 полипептидных цепей. Он принимает электроны от NADH и передает их через флавин и по меньшей мере пять железо-серных центров на убихинон - небольшую жирорастворимую молекулу (см. рис. 7-30), передающую электроны на второй комплекс дыхательных ферментов - *комплекс b-*c_1.

***2.* Комплекс b-**c_1 состоит по меньшей мере из 8 разных полипептидных цепей и, вероятно, существует в виде димера с мол. массой 500 000. Каждый мономер содержит три гема, связанных с цитохромами, и железо-серный белок. Комплекс принимает электроны от убихинона и передает цитохрому *с,* небольшому периферическому мембранному белку (см. рис. 7-28), который затем переносит их на цитохромоксидазный комплекс.

3. Цитохромоксидазный комплекс (цитохром *aa_3)* - наиболее изученный из трех комплексов. Он состоит не менее чем из восьми различных

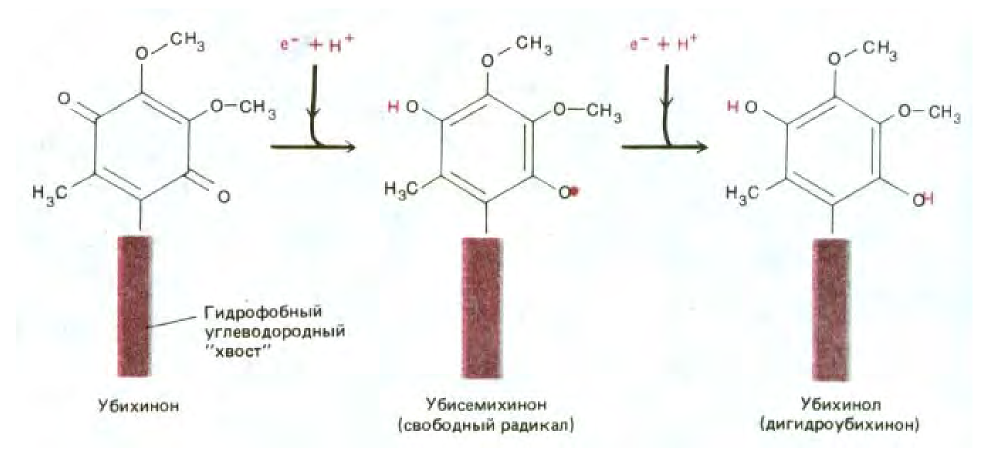


Рис. 7-30. Хиноны - важные переносчики электронов в дыхательной цепи. На каждый принятый электрон хинон захватывает из окружающей водной среды по одному протону; при этом он способен переносить как один, так и два электрона. Когда хинон отдает свои электроны следующему переносчику, протоны высвобождаются. В митохондриях млекопитающих хинон представлен убихиноном (коферментом Q), показанным на рисунке; длинный гидрофобный хвост, удерживающий убихинон в мембране, обычно состоит из 10 пятиуглеродных изопреновых единиц. У растений соответствующим переносчиком служит пластохинон, который почти не отличается от убихинона. Для простоты убихинон и пластохинон обычно называют просто хинонами и обозначают Q.

полипептидных цепей и выделен как димер с мол. массой 300000; каждый мономер содержит два цитохрома и два атома меди. Этот комплекс принимает электроны от цитохрома *c* и передает их на кислород.

Цитохромы, железо-серные центры и атомы меди способны переносить одновременно только один электрон. Между тем каждая молекула NADH отдает два электрона и каждая молекула O_2 должна принять четыре электрона при образовании молекул воды. В электрон-транспортной цепи имеется несколько электронсобирающих и электронраспределяющих участков, где согласовывается разница в числе электронов. Так, например, цитохромоксидазный комплекс принимает от молекул цитохрома *c* по отдельности четыре электрона и в конечном итоге передает их на одну связанную молекулу O_2, что ведет к образованию двух молекул воды. На промежуточных ступенях этого процесса два электрона, прежде чем перейти к участку, связывающему кислород, поступают в гем цитохрома *a* и связанный с белком атом меди, Cu_a. В свою очередь участок связывания кислорода содержит еще один атом меди и гем цитохрома a_3. Однако механизм образования двух молекул воды в результате взаимодействия связанной молекулы O_2 с четырьмя протонами в точности не известен.

В большинстве клеток с цитохромоксидазой взаимодействует около 90% всего поглощаемого кислорода. Токсичность таких ядов, как цианид и азид, связана с их способностью прочно присоединяться к цитохромоксидазному комплексу и блокировать тем самым весь транспорт электронов.

7.2.7. Перенос электронов осуществляется путем случайных столкновений между донорами и акцепторами электронов, диффундирующими во внутренней митохондриальной мембране [19]

Два компонента, переносящие электроны между тремя главными ферментными комплексами дыхательной цепи, - *убихинон и цитохром c* - быстро перемещаются путем диффузии в плоскости мембраны.



Рис. 7-31. Общая схема метода, с помощью которого определяют путь перемещения электронов по дыхательной цепи. Степень окисленности переносчиков электронов *a, b, c* и *d* непрерывно прослеживают по изменениям их спектров в окисленном и восстановленном состоянии. *А.* В обычных условиях все переносчики находятся в частично окисленном состоянии. Если добавить специфический ингибитор электронного транспорта, то все переносчики, находящиеся «ниже» места действия ингибитора, становятся более окисленными, а те, что находятся «выше», - более восстановленными. *Б.* В отсутствие кислорода все переносчики находятся в своих полностью восстановленных состояниях. При внезапном поступлении кислорода переносчики переходят в частично окисленную форму; этот процесс окисления идет с запаздыванием, которое тем больше, чем «выше» расположен в цепи переносчик.



Рис. 7-32. Строение молекул относительно мягких анионных детергентов холата и дезоксихолата. Хотя оба детергента достаточно сильны, чтобы солюбилизировать мембранные белки, их часто можно применять без ущерба для активности ферментов.

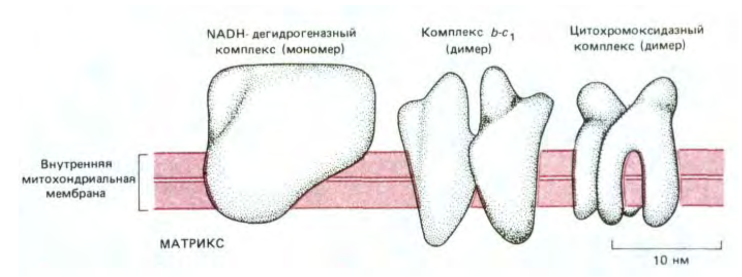


Рис. 7-33. Относительные размеры и форма трех дыхательных ферментных комплексов. Эти грубые трехмерные модели были построены на основе изображений, полученных от двумерных кристаллов (кристаллических слоев) при исследовании их под разными углами с помощью электронного микроскопа.

Столкновения между этими подвижными переносчиками и ферментными комплексами вполне позволяют объяснить наблюдаемую скорость переноса электронов (каждый комплекс отдает и принимает один электрон каждые 5-20 миллисекунд). Поэтому нет необходимости предполагать структурную упорядоченность цепи белков-переносчиков в липидном бислое; в самом деле, ферментные комплексы, видимо, существуют в мембране как независимые компоненты и упорядоченный перенос электронов обеспечивается только специфичностью функциональных взаимодействий между компонентами цепи.

В пользу этого говорит и тот факт, что различные компоненты Дыхательной цепи присутствуют в совершенно разных количествах. Например, в митохондриях сердца на каждую молекулу NADH-детидрогеназного комплекса приходятся 3 молекулы комплекса b-c_1, 7 молекул цитохромоксидазного комплекса, 9 молекул цитохрома с и 50 молекул убихинона; весьма различные соотношения этих белков обнаружены и в некоторых других клетках.

7.2.8. Значительный перепад окислительно-восстановительного потенциала на каждом из трех комплексов дыхательной цепи доставляет энергию, необходимую для перекачивания протонов [12, 20]

Такую пару, как H_2O и $^1/_2O_2$ (или NADH и NAD^+), называют сопряженной окислительно-восстановительной парой, так как один из ее членов превращается в другой, если добавить один или несколько электронов и один или несколько протонов (последних всегда достаточно в любом водном растворе). Так, например,

$$^1/_2O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O.$$

Хорошо известно, что смесь соединений, образующих *сопряженную кислотно-щелочную пару,* в соотношении 50:50 действует как буфер, поддерживающий определенное «давление протонов» (pH), величина которого определяется константой диссоциации кислоты. Точно таким же образом смесь компонентов сопряженной окислительно-восстановительной пары в соотношении 50:50 поддерживает определенное «давление электронов», или **окислительно-восстановительный потенциал** (редокс-потенциал) *E,* служащий мерой сродства молекулы-переносчика к электронам.

Помещая электроды в раствор с соответствующими окислительно-восстановительными парами, можно измерить редокс-потенциал каждого переносчика электронов, участвующего в биологических окислительно-восстановительных реакциях. Пары соединений с наиболее отрицательными значениями редокс-потенциала обладают наименьшим средством к электронам, т. е. содержат переносчики с наименьшей тенденцией принимать электроны и наибольшей тенденцией их отдавать. Например, смесь NADH и NAD^+ (50:50) имеет редокс-потенциал — 320 мВ, что указывает на сильно выраженную способность NADH отдавать электроны, тогда как редокс-потенциал смеси равных количеств H_2O и $^1/_2O_2$ составляет +820 мВ, что означает сильную тенденцию O_2 к принятию электронов.

Окислительно-восстановительные потенциалы можно измерять для всех переносчиков электронтранспортной цепи, различимых по их спектрам. Можно, например, шунтировать цепь, добавляя небольшие молекулы, способные легко отдавать и принимать электроны. При этом производят спектральные измерения, чтобы определить отношение

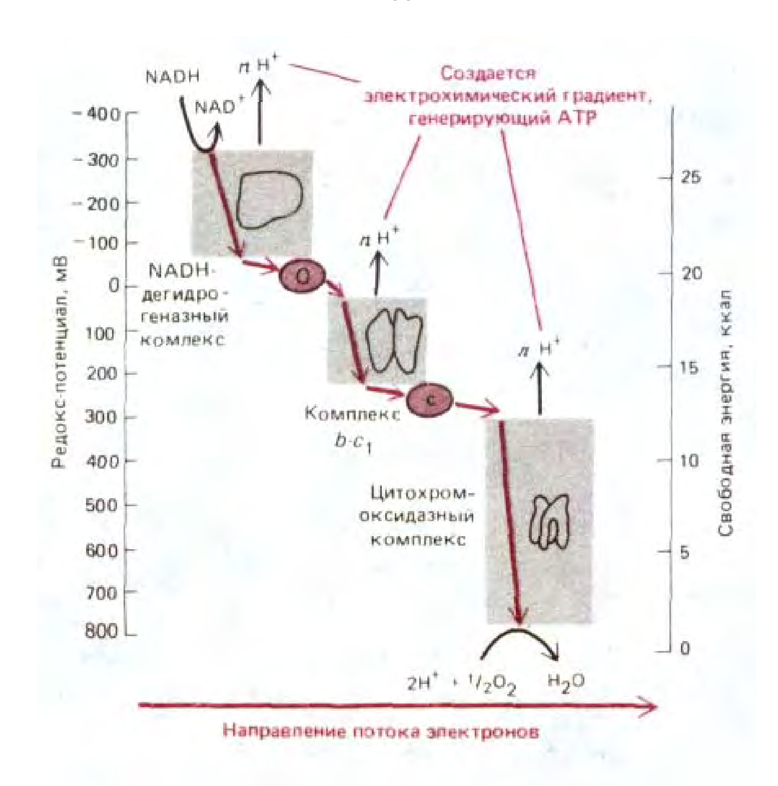


Рис. 7-34. Возрастание редокс-потенциала (обозначаемого E'_0 или E_h) по мере прохождения электронов по дыхательной цепи к кислороду. На оси ординат справа - величины стандартной свободной энергии переноса каждого из двух электронов, отдаваемых одной молекулой NADH [$\Delta G = -n(0{,}023)\Delta E_0$`, где n - число переносимых электронов при перепаде редокс-потенциала $\Delta E_0'$ мВ]. В каждом дыхательном ферментном комплексе электроны последовательно проходят через четыре или большее число переносчиков. Как уже говорилось, часть высвобождаемой энергии используется каждым ферментным комплексом для перекачивания протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Число протонов, перекачиваемых на каждый переносимый электрон *(n),* точно не известно.

Два электрона от $FADH_2$, образованного при окислении жирных кислот (см. рис. 7-11) и в цикле лимонной кислоты (см. рис. 7-14), дают меньше полезной энергии, чем два электрона от NADH. Поскольку редокс-потенциал $FADH_2$ близок к 0 мВ, при переносе электронов с $FADH_2$ на убихинон не происходит запасания энергии (на схеме это не показано). Поэтому транспорт электронов от $FADH_2$ до кислорода приводит к перемещению протонов только на двух, а не на трех участках дыхательной цепи.

концентраций окисленной и восстановленной форм для каждого переносчика; для этого ступенчатым образом изменяют редокс-потенциал шунтирующего раствора. Как и следовало ожидать, оказалось, что потенциалы возрастают вдоль по ходу цепи переносчиков. У большинства цитохромов они выше, чем у железо-серных центров; и соответственно цитохромы обычно располагаются вблизи O_2-конца дыхательной цепи, а железо-серные белки - вблизи NADH-конца.

На рис. 7-34 показаны уровни окислительно-восстановительного потенциала на различных участках дыхательной цепи. Резкий перепад имеет место в пределах каждого из трех главных дыхательных комплексов. Разность потенциалов между любыми двумя переносчиками электронов прямо пропорциональна энергии, высвобождаемой при переходе электрона от одного переносчика к другому (рис. 7-34). Каждый комплекс действует как энергопреобразующее устройство, направляя эту свободную энергию на перемещение протонов через мембрану, что приводит к созданию электрохимического протонного градиента по мере прохождения электронов по цепи. Такое преобразование энергии можно прямо продемонстрировать, включив по отдельности любой изолированный комплекс дыхательной цепи в липосомы (см. рис. 7-25). В присутствии подходящего донора и акцептора электронов такой комплекс будет переносить электроны, что приведет к перекачиванию протонов через мембрану липосомы.

Для работы энергопреобразующего механизма, лежащего в основе окислительного фосфорилирования, нужно, чтобы каждый ферментный комплекс дыхательной цепи был ориентирован во внутренней митохондриальной мембране определенным образом - так, чтобы все протоны перемещались в одном направлении, т. е. из матрикса наружу (рис. 7-35). Такая *векторная организация* мембранных белков была продемонстрирована с помощью специальных зондов, не проходящих сквозь мембрану, которыми метили комплекс только с какой-нибудь одной стороны мембраны (разд. 6.2.3). Специфическая ориентация в бислое свойственна всем мембранным белкам и очень важна для их функции.

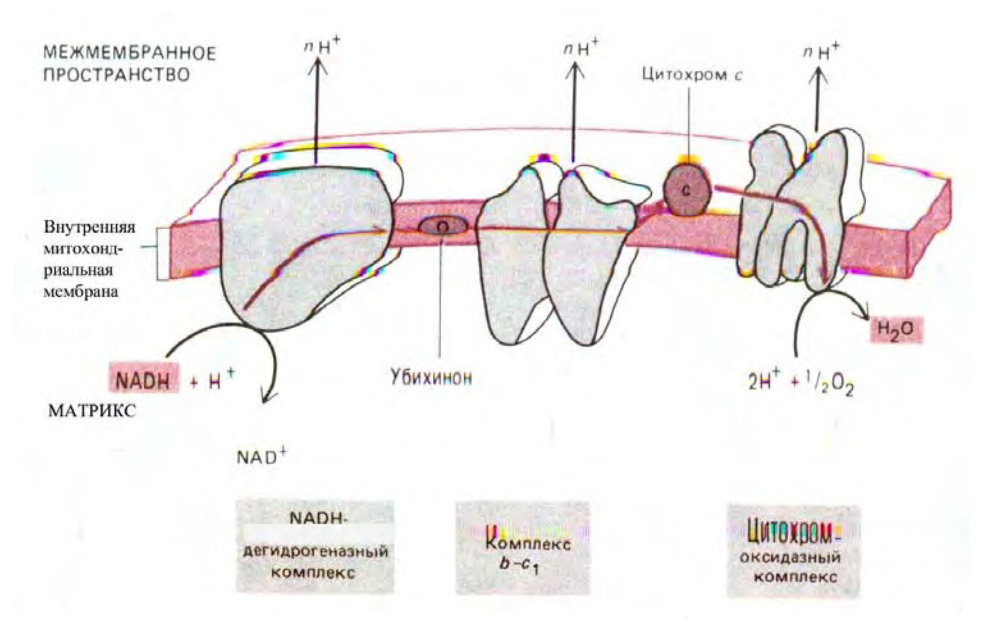


Рис. 7-35. Схема переноса двух электронов через три главных дыхательных комплекса от NADH к кислороду. В качестве переносчиков между комплексами выступают убихинон и цитохром *c*.

7.2.9. Механизмы перекачивания протонов компонентами дыхательной цепи еще не вполне ясны

В процессе окислительного фосфорилирования при окислении одной молекулы NADH (т. е. при прохождении *двух* электронов через все три ферментных комплекса) образуется не более трех молекул АТР. Если предположить, что обратное прохождение трех протонов через АТР-синтетазу обеспечивает синтез одной молекулы АТР (разд. 7.2.3), можно будет заключить, что в среднем перенос одного электрона каждым комплексом сопровождается перемещением полутора протонов (иными словами, при транспорте одного электрона некоторые комплексы перекачивают один протон, а другие - два протона).

Вероятно, у разных компонентов дыхательной цепи существуют разные механизмы сопряжения транспорта электронов с перемещением протонов. Аллостерические изменения конформации белковой молекулы, связанные с транспортом электронов, могут в принципе сопровождаться «перекачиванием» протонов, подобно тому как перемещаются протоны при обращении действия АТР-синтетазы (разд. 7.2.3). Кроме того, как уже упоминалось, при переносе каждого электрона хинон захватывает из водной среды протон, который затем отдает при высвобождении электрона (см. рис. 7-30). Поскольку убихинон свободно передвигается в липидном бислое, он может принимать электроны вблизи внутренней поверхности мембраны и передавать их на комплекс b-c_1 около ее наружной поверхности, перемещая при этом через бислой по одному H^+ на каждый перенесенный электрон. С помощью более сложных моделей можно объяснить и перемещение комплексом b-c_1 двух протонов на каждый электрон, предположив, что убихинон повторно проходит через комплекс b-c_1 в определенном направлении.

В отличие от этого молекулы, передающие электроны цитохромоксидазному комплексу, по-видимому, не переносят протонов, и в этом случае транспорт электронов, вероятно, связан с определенным аллостерическим изменением конформации белковых молекул, в результате которого какая-то часть белкового комплекса сама переносит протоны.

7.2.10. H^+-ионофоры рассеивают протонный градиент и тем самым разобщают транспорт электронов и синтез АТР [22]

С 40-х годов известен ряд липофильных слабых кислот, способных действовать как *разобщающие агенты,* т. е. нарушать сопряжение

транспорта электронов с синтезом ATP. При добавлении к клеткам этих низкомолекулярных органических соединений митохондрии прекращают синтез ATP, продолжая при этом поглощать кислород. В присутствии разобщающего агента скорость транспорта электронов остается высокой, но протонный градиент не создается. Существует простое и изящное объяснение этого эффекта: разобщающие агенты действуют как переносчики H^+ (H^+ -ионофоры) и открывают дополнительный путь - уже не через АТР-синтетазу - для потока H^+ через внутреннюю митохондриальную мембрану. Этот механизм показан на рис. 7-36 на примере широко используемого разобщителя 2,4-динитрофенола.

7.2.11. В нормальных условиях поток электронов по дыхательной цепи сдерживается дыхательным контролем [23]

Когда к клеткам добавляют разобщающий агент, например динитрофенол, поглощение кислорода митохондриями значительно возрастает, так как скорость переноса электронов увеличивается. Такое ускорение связано с существованием **дыхательного контроля.** Полагают, что этот контроль основан на прямом ингибирующем влиянии электрохимического протонного градиента на транспорт электронов. Когда в присутствии разобщителя электрохимический градиент исчезает, не контролируемый более транспорт электронов достигает максимальной скорости. Возрастание градиента притормаживает дыхательную цепь, и транспорт электронов замедляется. Более того, если в эксперименте искусственно создать на внутренней мембране необычно высокий электрохимический градиент, то нормальный транспорт электронов прекратится совсем, а на некоторых участках дыхательной цепи можно будет обнаружить *обратный поток электронов.* Это позволяет предполагать, что дыхательный контроль отражает простой баланс между изменением свободной энергии при перемещении протонов, сопряженного с транспортом электронов, и изменением свободной энергии при самом транспорте электронов; другими словами, величина электрохимического градиента влияет как на скорость, так и на направление переноса электронов, так же как и на направление действия АТР-синтетазы (разд. 7.2.3).

Дыхательный контроль - это лишь часть сложной системы взаимосвязанных регуляторных механизмов с обратными связями, координирующей скорости гликолиза, расщепления жирных кислот, реакций цикла лимонной кислоты и транспорта электронов. Скорости всех этих процессов зависят от отношения ATP: ADP - они возрастают, когда это отношение уменьшается в результате усиленного использования ATP. Например, АТР-синтетаза внутренней митохондриальной мембраны работает быстрее, когда концентрации ее субстратов, т. е. ADP и P_i, увеличиваются. Чем выше скорость этой реакции, тем больше протонов перетекает в матрикс, быстрее рассеивая тем самым электрохимический градиент; а уменьшение градиента в свою очередь приводит к ускорению транспорта электронов.

Сходные регуляторные механизмы, в том числе ингибирование ряда ключевых ферментов аденозинтрифосфатом (ATP) по принципу обратной связи (см., например, рис. 7-13), координируют скорость образования NADH с его утилизацией дыхательной цепью. Благодаря этим многочисленным приспособлениям организм при большой физической нагрузке окисляет жиры и сахара в 5-10 раз быстрее, чем во время отдыха.

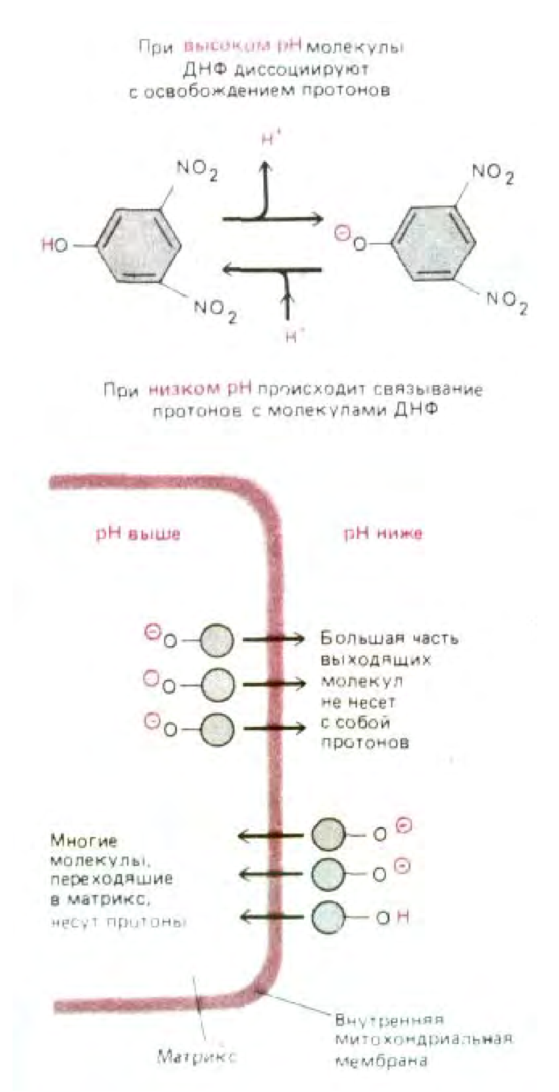


Рис. 7-36. Перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану при участии разобщающего агента 2,4-динитрофенола (ДНФ). Заряженная (протонированная) форма ДНФ может свободно проходить через липидный бислой. Полагают, что перенос заряженной формы ДНФ через мембрану осуществляется с помощью анион-транспортного белка (на схеме не представленного). Как показано на рисунке, благодаря электрохимическому протонному градиенту молекулы динитрофенола будут переносить больше протонов в матрикс, чем из него, до тех пор, пока протонодвижущая сила не исчезнет полностью.

7.2.12. Природные разобщители превращают митохондрии бурой жировой ткани в генераторы тепла [24]

В некоторых специализированных клетках - клетках бурой жировой ткани - митохондриальное дыхание может естественным путем отделяться от синтеза АТР, и тогда большая часть энергии окисления рассеивается в виде тепла, а не превращается в энергию АТР. Внутренняя мембрана крупных митохондрий этих клеток содержит особый транспортный белок, позволяющий протонам перемещаться по их электрохимическому градиенту без активации АТР-синтетазы. В результате клетки окисляют запасы жира с большой скоростью и образуют много тепла, но мало АТР. Таким образом, бурая жировая ткань служит своего рода печкой, которая в нужный момент пробуждает животное, погруженное в зимнюю спячку, а у новорожденного ребенка защищает наиболее чувствительные части тела от переохлаждения.

7.2.13. Все бактерии используют хемиосмотические механизмы

Бактерии извлекают энергию из самых разнообразных источников. Некоторые бактерии, подобно животным клеткам, синтезируют АТР, окисляя сахара до СО, и H_2O в процессе гликолиза и затем в цикле лимонной кислоты; в плазматической мембране таких бактерий имеется дыхательная цепь, сходная с аналогичной цепью внутренней митохондриальной мембраны. Бактерии других типов - строгие анаэробы получают энергию только за счет реакций гликолиза (брожения) или же за счет окислительных процессов, но конечным акцептором электронов у них служит не кислород, а какая-либо иная молекула. Такими альтернативными акцепторами могут быть соединения азота (нитрат или нитрит), серы (сульфат или сульфит) или углерода (фумарат или карбонат). Электроны передаются на эти акцепторы с помощью ряда переносчиков, находящихся в плазматической мембране и сходных с компонентами дыхательной цепи митохондрий.

Несмотря на все эти различия, в плазматической мембране большинства бактерий имеется АТР-синтетаза, очень сходная с АТР-синтетазой митохондрий (и хлоропластов). У анаэробов, не имеющих цепи переноса электронов, АТР-синтетаза работает в обратном направлении - использует образованный в результате гликолиза АТР для создания на плазматической мембране протонодвижущей силы. У аэробных бактерий протонодвижущую силу, заставляющую АТР-синтетазу синтезировать АТР, создает цепь переноса электронов.

Почти все бактерии, включая строгих анаэробов, поддерживают на своей мембране протонодвижущую силу. Энергия электрохимического протонного градиента используется у них для вращения бактериального жгутика, что позволяет клетке передвигаться (разд. 12.5.4), и для



Рис. 7-37. Протонодвижущая сила, генерируемая на плазматической мембране бактериальной клетки, обеспечивает перенос внутрь питательных веществ и выведение наружу натрия. В присутствии кислорода *(А)* дыхательная цепь аэробных бактерий создает электрохимический протонный градиент, который используется АТР-синтетазой для синтеза АТР, а также для переноса в клетку некоторых питательных веществ. В анаэробных условиях (Б) те же бактерии получают АТР в результате гликолиза. За счет гидролиза части этого АТР под действием АТР-синтетазы создается трансмембранная протонодвижущая сила, доставляющая энергию для транспортных процессов. (Как описано в тексте, существуют бактерии, у которых цепь переноса электронов откачивает протоны при анаэробных условиях; конечным акцептором электронов в этом случае служит не кислород, а какая-то другая молекула.)

откачивания из клетки ионов H^+ с помощью механизма антипорта, заменяющего здесь Na^+ K^+-АТРазу эукариотических клеток. В животных клетках активное поглощение веществ через плазматическую мембрану осуществляется в основном за счет энергии натриевого градиента, создаваемого Na^+ K^+-АТРазой (разд. 6.4.9). В отличие от этого у бактерий активный перенос питательных веществ в клетку происходит путем H^+ -симпорта, при котором необходимые метаболиты поступают в клетку вместе с одним или несколькими протонами при участии специального белка-переносчика. Таким способом в клетку транспортируются многие сахара и большинство аминокислот (рис. 7-37).

Среди многообразных типов бактерий есть формы, которые приспособились к крайне неблагоприятным условиям среды. Например, некоторые бактерии живут в сильнощелочной среде и для защиты своих неустойчивых к щелочи молекул, таких, как РНК, должны поддерживать внутри клетки более низкие значения pH, чем снаружи. В таких случаях созданию электрохимического протонного градиента препятствовал бы значительный градиент концентрации протонов, направленный в обратную сторону (уровень H^+ выше внутри, чем снаружи). Вероятно, по этой причине толерантные к щелочи морские бактерии *Vibrio alginolyticus* используют во всех хемиосмотических механизмах Na^+ , а не H^+ . Дыхательная цепь этих бактерий откачивает из клетки Na^+, поглощение метаболитов сопряжено с переходом внутрь Na^+ , жгутик движется за счет входящего тока Na^+ , и, по-видимому, большая часть АТР синтезируется АТР-синтетазой, приводимой в действие ионами Na^+ . Существование таких бактерий показывает, что принцип хемиосмоса более фундаментален, чем его обычный частный случай - использование электрохимического протонного градиента.

Заключение

Дыхательная цепь внутренней митохондриальной мембраны содержит три главных ферментных комплекса, участвующих в переносе электронов с NADH на O_2. Если любой из этих комплексов выделить и встроить в мембрану липосомы, то можно продемонстрировать способность его переносить через эту мембрану протоны одновременно с транспортом электронов. В естественной мембране цепь переноса электронов дополняют мобильные переносчики - убихинон и цитохром с, передвигающиеся, подобно челнокам, от одного ферментного комплекса к другому и обратно. Путь электронов в этой цепи можно представить следующей схемой: NADH → NADH-дегидрогеназный комплекс → убихинон → комплекс b-c_1 → цитохром с → цитохромоксидазный комплекс - молекулярный кислород (O_2).

Дыхательные ферментные комплексы сопрягают транспорт электронов, сопровождающийся выделением энергии, с откачиванием протонов из матрикса. Создаваемый при этом электрохимический протонный градиент доставляет энергию для синтеза АТР еще одним трансмембранным белковым комплексом-АТР-синтетазой, через которую протоны возвращаются в матрикс. АТР-синтетаза - это обратимый сопрягающий комплекс; в норме он преобразует энергию потока протонов, направленного в матрикс, в энергию фосфатных связей АТР, но при уменьшении электрохимического протонного градиента он способен также использовать энергию гидролиза АТР для перемещения протонов из матрикса наружу. Хемиосмотические механизмы свойственны как митохондриям и хлоропластам, так и бактериям, что указывает на исключительную важность их для всех клеток.

Всем животным и большинству микроорганизмов необходимо все время получать из окружающей среды большие количества органических веществ. Эти вещества доставляют углеродные остовы для биосинтезов и метаболическую энергию для всех клеточных процессов. Полагают, что первые организмы древней Земли располагали избытком органических соединений, образовавшихся в результате геохимических процессов (см. разд. 1.1.1). Однако большая часть этих соединений была уже использована миллиарды лет назад. С тех времен почти все органические материалы, необходимые для живых клеток, производятся *фотосинтезирующими организмами,* в том числе разного рода фотосинтезирующими бактериями. Эволюционно наиболее продвинутые из таких бактерий - цианобактерии - обладают минимальными потребностями в питательных веществах. Для превращения атмосферной двуокиси углерода (CO_2) в органические соединения они используют солнечную энергию и воду, служащую источником электронов. Кроме того, при расщеплении воды [при реакции $nH_2O + nCO_2 \xrightarrow{\text{свет}} n(CH_2O)_n + nO_2$] они выделяют в атмосферу кислород, необходимый для окислительного фосфорилирования. Как мы объясним позже, вероятно, именно эволюция цианобактерии из более примитивных фотосинтезирующих бактерий сделала возможным развитие первых аэробных форм жизни.

У растений, которые появились позднее, фотосинтез протекает в специализированных внутриклеточных органеллах - хлоропластах. Однако хлоропласты доставляют энергию для метаболизма только в дневные часы; ночью они прекращают синтез высокоэнергетических метаболитов, и в это время суток растения получают АТР в результате деятельности митохондрий, которые у них очень сходны с митохондриями животных клеток.

Основываясь главным образом на биохимических данных, полагают, что хлоропласты - это потомки цианобактерии, которые захватывались эукариотами путем эндоцитоза и перешли к симбиозу с ними. Так же объясняют и происхождение митохондрий. Согласно этой теории, многочисленные различия между хлоропластами и митохондриями обусловлены отчасти их происхождением от разных бактериальных

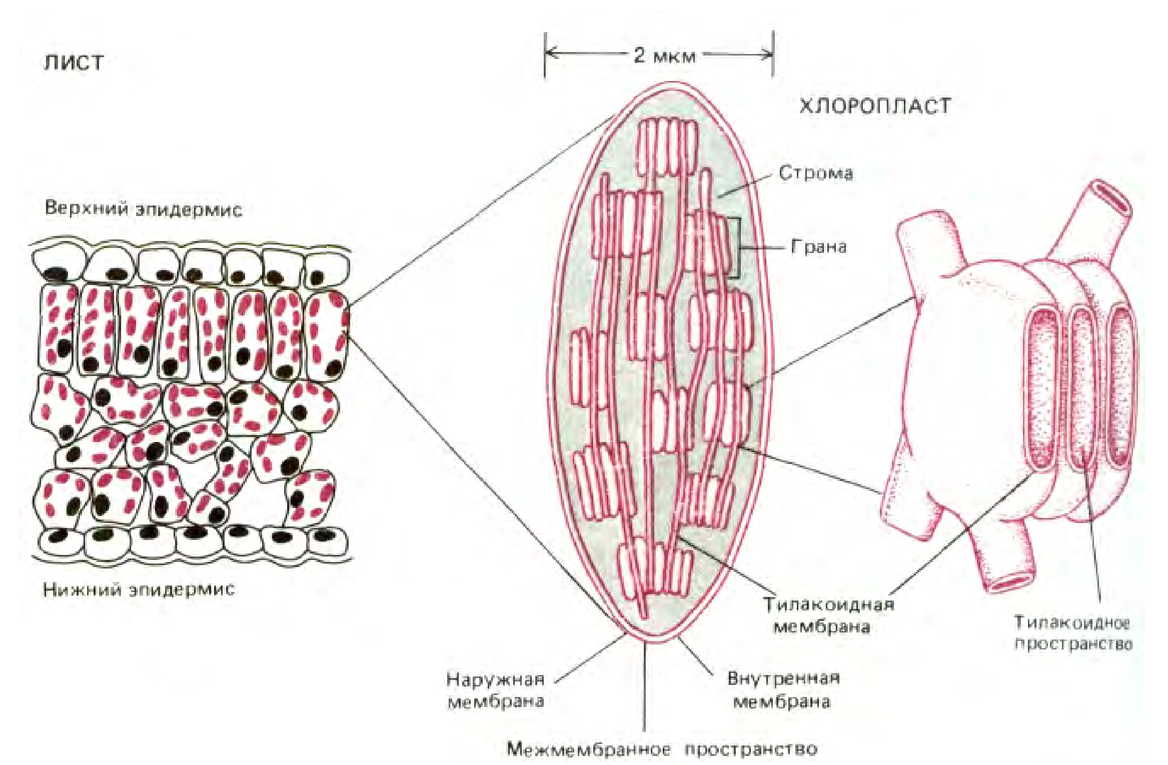


Рис. 7-38. Хлоропласты содержат три мембраны - наружную, внутреннюю и тилакоидную, которые делят органеллу на три внутренних компартмента: межмембранное пространство, строму и тилакоидное пространство. В тилакоидной мембране находятся все энергетические системы хлоропласта. На электронной микрофотографии эти мембраны выглядят разбитыми на отдельные фрагменты, имеющие вид уплощенных пузырьков (см. рис. 7-39), но в хлоропласте они, вероятно, соединены в одну мембрану, образующую многочисленные складки. Как видно из рисунка, отдельные тилакоиды связаны между собой в стопкообразные структуры, называемые гранами.

предков, а отчасти последующей эволюционной дивергенцией. Тем не менее фундаментальные механизмы синтеза ATP в хлоропластах и митохондриях очень сходны, хотя в первых он идет за счет энергии света, а во вторых - за счет энергии, доставляемой дыханием.

7.3.1. Хлоропласты сходны с митохондриями, но имеют один дополнительный компартмент

Хлоропласты, так же как и митохондрии, используют для преобразования энергии хемиосмотический механизм, и в основе организации тех и других органелл лежат одни и те же принципы (рис. 7-38 и 7-39). Хлоропласты тоже обладают высокопроницаемой наружной мембраной и гораздо менее проницаемой внутренней, в которую встроены специальные транспортные белки, и эти две мембраны разделены узким межмембранным пространством. Внутренняя мембрана окружает большую центральную область - так называемую **строму,** представляющую собой аналог митохондриального матрикса и содержащую разнообразные ферменты, рибосомы, РНК и ДНК.

Однако есть и существенное отличие. Внутренняя мембрана хлоропластов не образует крист и не содержит в себе цепи переноса электронов. Фотосинтезирующая поглощающая свет система, электрон-транспортная цепь и ATP-синтетаза находятся в третьей мембране,

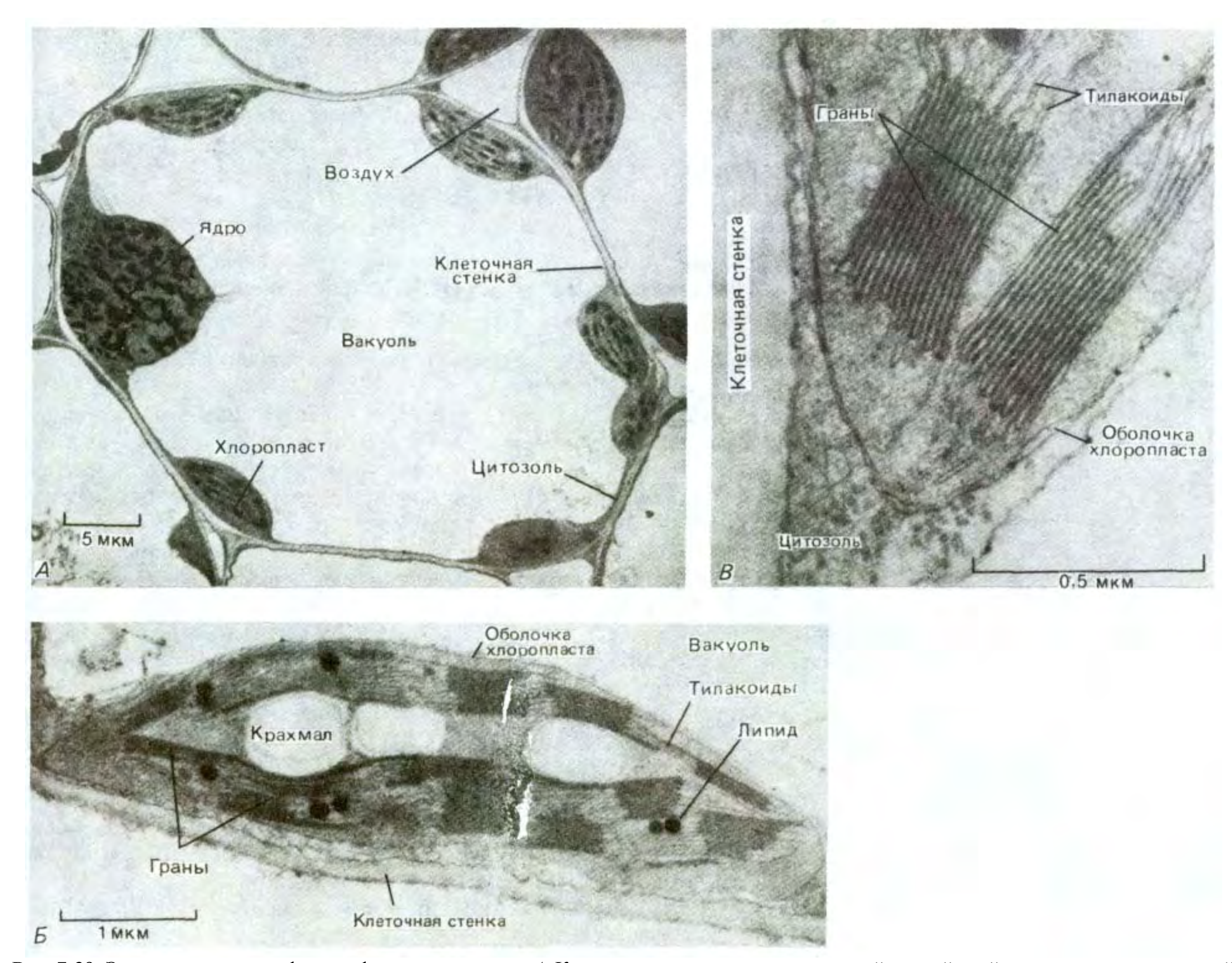


Рис. 7-39. Электронные микрофотографии хлоропластов. *А.* Клетка из листа пшеницы, в которой тонкий слой цитоплазмы, содержащей хлоропласты, окружает большую вакуоль. *Б.* Тонкий срез одного хлоропласта; видны зерна крахмала и жировые капельки, накапливающиеся в строме в результате биосинтеза. *В.* Граны при большом увеличении: видна тилакоидная мембрана, образующая стопки. (С любезного разрешения K. Plaskitt.)

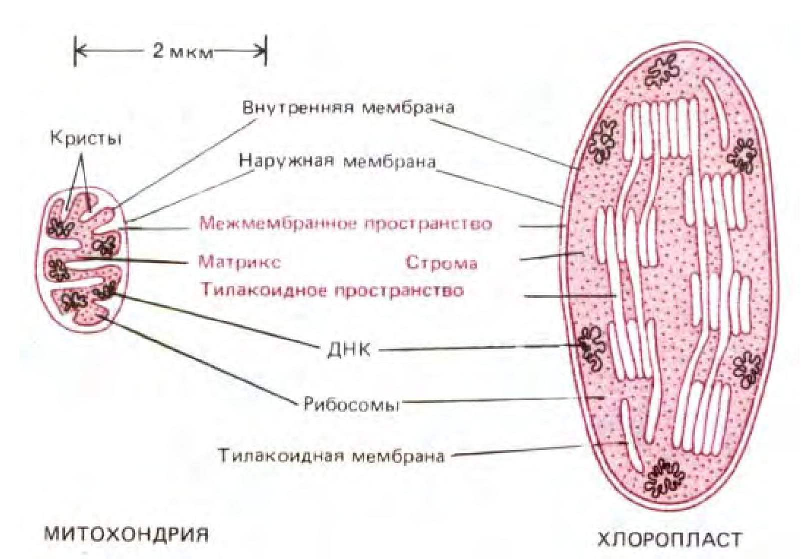


Рис. 7-40. Сравнение структуры митохондрии и хлоропласта. Обычно хлоропласт намного больше и содержит тилакоидную мембрану и тилакоидное пространство. Внутренняя мембрана митохондрий образует кристы.

образующей группу уплощенных дисковидных мешочков - **тилакоидов** (рис. 7-38). Как полагают, внутренние полости тилакоидов сообщаются между собой, образуя третий, внутренний компартмент хлоропласта, называемый *тилакоидным пространством.* Это пространство отделено от стромы *тилакоидной мембраной.*

На рис. 7-40 показаны черты сходства и различия в строении митохондрий и хлоропластов. В общем виде хлоропласт можно представить как сильно увеличенную митохондрию, кристы которой образовали в матриксе цепочки связанных между собой субмитохондриальных частиц. В хлоропластах сферическая часть АТР-синтетазы, где образуется АТР, выступает из мембраны тилакоида в область стромы, точно так же как в митохондриях она выступает из внутренней мембраны в сторону матрикса (см. рис. 7-51).

7.3.2. В хлоропластах осуществляются две уникальные реакции: образование ATP и NADPH за счет энергии света и превращение CO_2 в углеводы [26]

Разнообразные реакции, протекающие при фотосинтезе, можно разделить на две большие группы.

1. В реакциях фотосинтетического **переноса электронов** (иногда называемых световыми реакциями) лучистая энергия возбуждает электрон в молекуле *хлорофилла,* что делает возможным перенос электрона по окислительной цепи в тилакоидной мембране, аналогичный переносу его по дыхательной цепи во внутренней мембране митохондрий. В результате такого транспорта электронов происходит перекачивание протонов через тилакоидную мембрану, и создающаяся протонодвижущая сила доставляет энергию для синтеза АТР в строме. В то же время высокоэнергетические электроны, образуемые в окислительной цепи, восстанавливают $NADP^+$ до NADPH. Источником электронов, участвующих в этом процессе, служит окисление воды, при котором выделяется O_2.

2. В реакциях фиксации углерода (называемых иногда темновыми реакциями) происходит превращение CO_2 в углеводы, причем в качестве источника энергии и восстанавливающего агента используются соответственно ATP и NADPH, синтезированные в реакциях фотосинтетического переноса электронов. В результате этих реакций, начинающихся в строме хлоропласта и продолжающихся в цитозоле, в листьях образуется сахароза, откуда она доставляется к другим частям растения, где служит источником энергии для роста и используется при синтезе органических молекул.

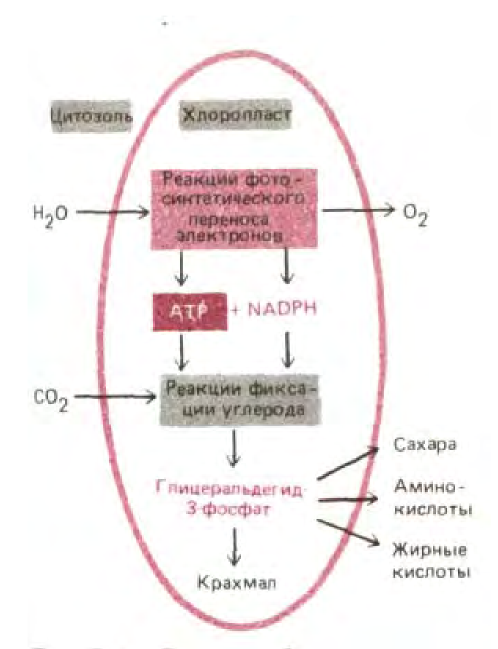


Рис. 7-41. Реакции фотосинтеза, протекающие в хлоропластах, можно подразделить на электрон-транспортирующие реакции и реакции фиксации углерода. В первой группе реакций окисляется вода и выделяется O_2, а во второй группе ассимилируется CO_2 и образуются органические молекулы.

Таким образом, освобождение молекулярного кислорода (требующее прямого участия лучистой энергии) и превращение CO_2 в углеводы (не требующее прямого участия света) - это два отдельных процесса (рис. 7-41). Но, как мы увидим позднее, эти два процесса соединены тонким механизмом обратных связей, что необходимо для регулирования процессов биосинтеза. Например, образование ATP и NADPH в тилакоидных мембранах меняется в зависимости от потребности клетки в этих молекулах, а некоторые ферменты хлоропластов, необходимые для фиксации углерода, инактивируются в темноте и восстанавливают свою активность под влиянием электронтранспортных процессов, стимулируемых светом.

7.3.3. Фиксацию углерода катализирует рибулозобисфосфаткарбоксилаза [28]

В этой главе мы уже познакомились с тем, как клетки используют большое количество энергии, выделяющейся при окислении углеводов до CO_2 и H_2O, для синтеза ATP. Из этого должно быть ясно, что обратный процесс - образование углеводов из CO_2 и H_2O требует значительных затрат энергии и может происходить только при сопряжении с другими реакциями, при которых, наоборот, много энергии выделяется.

На рис. 7-42 приведена центральная реакция превращения неорганического углерода в органический: CO_2 (из атмосферы) реагирует с водой и пятиуглеродным соединением рибулозо-1,5-бисфосфатом, и в результате образуются две молекулы трехуглеродного соединения 3-фосфоглицерата. Эту реакцию, открытую в 1948 г., катализирует в строме хлоропласта большой (мол. масса 500000) фермент, называемый *рибулозобисфосфат-карбоксилазой.* Так как этот фермент работает очень медленно (одна его молекула за секунду обрабатывает примерно 3 молекулы субстрата, тогда как другие ферменты - обычно около 1000 молекул), требуется очень много копий рибулозобисфосфат-карбоксилазы. Этот фермент часто составляет более 50% всего белка хлоропластов, и утверждают, что по общей массе это самый распространенный белок в мире.

7.3.4. В цикле фиксации углерода на одну связанную молекулу CO_2 затрачиваются три молекулы ATP и две молекулы NADPH [29]

Хотя собственно реакция фиксации углерода не требует затраты энергии, для ее протекания нужен непрерывный приток высокоэнергетического *соединения-рибулозо-1,5-бисфосфата,* с которым связывается CO_2 (рис. 7-42). Работа по изучению сложного пути регенерации

Двуокись углерода — Рибулозо-1,5-бисфосфат — Промежуточный продукт — Две молекулы 3-фосфоглицерата

Рис. 7-42. Начальная реакция, в которой двуокись углерода превращается в органический углерод. Эту реакцию катализирует в строме хлоропласта содержащийся там в очень большом количестве фермент *рибулозобисфосфат-карбоксилаза,* и в результате образуется 3-фосфоглицерат, который является также и важнейшим промежуточным продуктом гликолиза (см. рис. 2-20). В случае если тот же фермент присоединяет кислород, а не CO_2 (см. разд. 7.3.5), два атома углерода, выделенные цветом, используются для образования фосфогликолата.

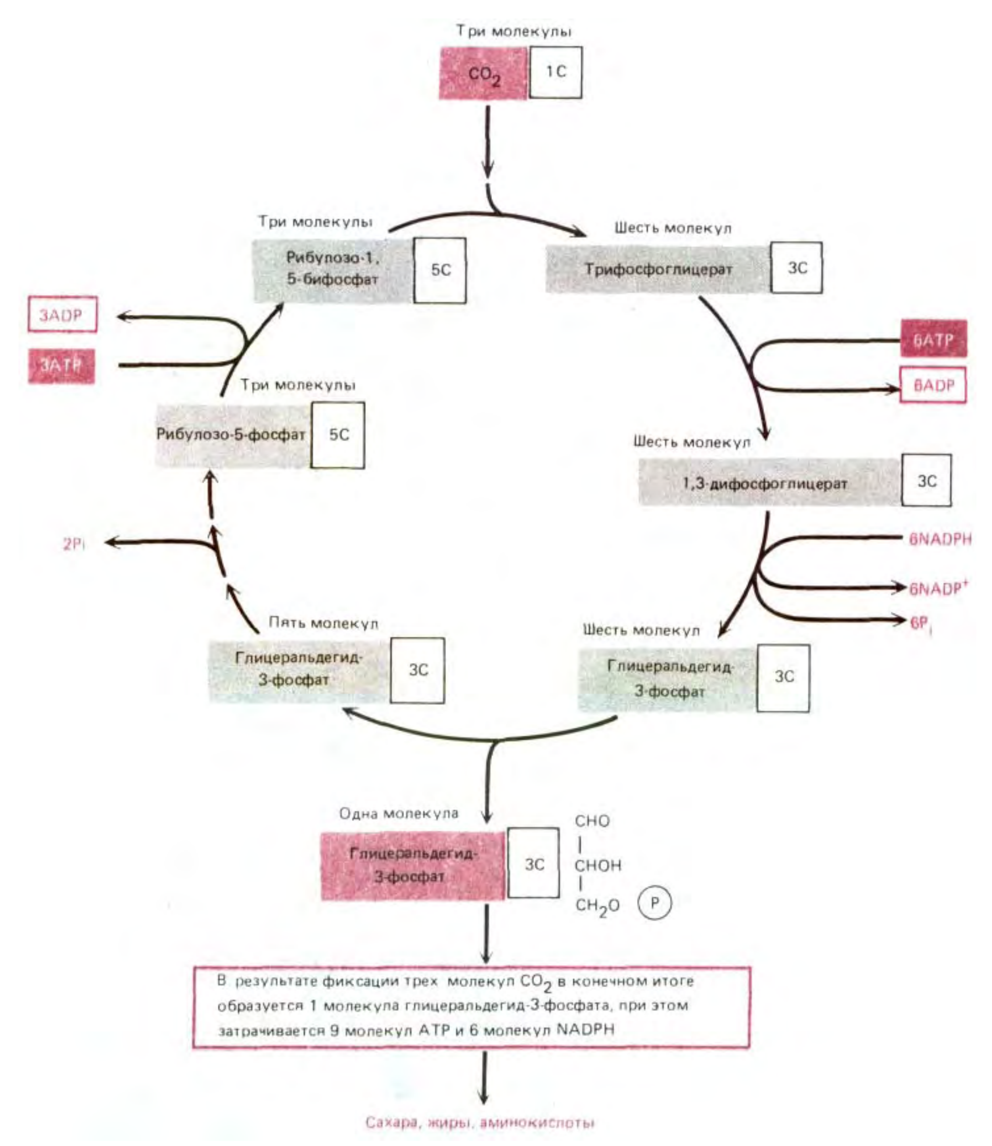


Рис. 7-43. Цикл фиксации углерода, в котором из CO_2 и H_2O образуются органические молекулы. Для упрощения схемы многие промежуточные продукты на пути от глице-ральдегид-3-фосфата к рибулозо-5-фосфату опущены. Участие воды в цикле также не показано.

рибулозо-1,5-бисфосфата явилась одним из самых ранних и наиболее успешных применений радиоизотопов в биохимии. Как показано на рис. 7-43, при участии трех молекул CO_2, вступивших в реакцию, катализируемую рибулозобисфосфат-карбоксилазой, образуется шесть молекул 3-фосфоглицерата, в совокупности содержащих 6·3 = 18 атомов углерода: 3 от CO_2 и 15 от рибулозо-1,5-бисфосфата. Затем эти 18 атомов углерода проходят цикл реакций, регенерирующих 3 молекулы рибулозо-1,5-бисфосфата (содержащие 3·5 = 15 атомов С), использованные в начале цикла. В конечном итоге прибавляется одна молекула *глицеральдегид-3-фосфата* (3 углеродных атома). В этом **цикле фиксации углерода** (цикл Кальвина - Бенсона) для связывания одной молекулы CO_2 затрачиваются три молекулы ATP и две молекулы NADPH. Суммарное уравнение реакций цикла имеет вид

$3CO_2$ + 9ATP + 6NADPH + Вода → Глицеральдегид-3-фосфат + + $8P_i$ + 9ADP + $6NADP^+$.

Таким образом, на построение органических молекул из CO_2 и H_2O затрачивается *энергия фосфатных связей* (в виде ATP) и *восстано-*

вительная сила (в виде NADPH). Позднее мы вернемся к этому моменту.

Глицеральдегид-3-фосфат, образующийся в хлоропластах в цикле фиксации углерода, представляет собой трехуглеродный углевод и является ключевым промежуточным продуктом гликолиза (разд. 2.3.2). Большая часть глицеральдегид-3-фосфата поступает в цитозоль, где быстро превращается в фруктозо-6-фосфат и глюкозо-1-фосфат в результате обратного протекания некоторых реакций гликолиза (разд. 2.5.3). Затем глюкозо-1 -фосфат превращается в углеводное производное нуклеотида, UDP-глюкозу, которая реагирует с фруктозо-6-фосфатом с образованием сахарозофосфата - непосредственного предшественника дисахарида **сахарозы.** У растений сахароза выполняет ту же функцию, что глюкоза у животных: это та основная форма, в которой сахара транспортируются из одних клеток в другие. По мере надобности сахароза переходит из листьев в остальные части растения по проводящим пучкам (см. рис. 7-45), подобно тому как глюкоза переносится с током крови в организме животного.

В строме из большей части оставшегося в хлоропластах глицеральдегид-3-фосфата образуется **крахмал.** Это высокомолекулярный полимер глюкозы, служащий, так же как гликоген в животных клетках, резервным углеводом. Крахмал образуется в строме хлоропласта во время избыточной фотосинтетической активности и там же запасается в виде крупных зерен (см. рис. 7-39, *Б).* Синтез крахмала происходит путем обращения реакций гликолиза, протекающих в строме: глицеральдегид-3-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат, из которого затем образуется ADP-глюкоза, представляющая собой непосредственный предшественник крахмала. Ночью крахмал расщепляется для удовлетворения метаболических нужд растения.

7.3.5. Для облегчения роста некоторых тропических растений в условиях низких концентраций CO_2 фиксация углерода в их листьях компартментализована [30]

Хотя рибулозобисфосфат-карбоксилаза присоединяет к рибулозо-1,5-фосфату преимущественно CO_2, при низких концентрациях углекислоты она будет присоединять к нему O_2. Это явно расточительный путь, при котором образуется одна молекула 3-фосфоглицерата и одна молекула двухуглеродного соединения фосфогликолата, а не две молекулы 3-фосфоглицерата (см. рис. 7-42). Фосфогликолат превращается в гликолат и поступает в пероксисомы, где из двух молекул гликолата синтезируется одна молекула 3-фосфоглицерата (три углеродных атома) и одна молекула CO_2. Так как в этом процессе потребляется O_2 и освобождается CO_2, он получил название *фотодыхания.* У многих растений около трети фиксированного углерода вновь высвобождается в виде CO_2 в результате фотодыхания. Пока не ясно, несет ли фотодыхание у растений какую-либо полезную функцию, или же это просто способ возвращения на путь фиксации углерода некоторой его части, превращенной в фосфогликолат из-за нежелательного взаимодействия кислорода с рибулозо-1,5-бисфосфатом.

Фотодыхание может стать серьезной помехой в жарких, засушливых условиях, где растениям приходится закрывать свои устьица (поры в листьях, служащие для газообмена), чтобы избежать чрезмерной потери влаги. В результате уровень CO_2 в листьях резко падает, что ведет к усилению фотодыхания. Однако в листьях многих растений, произрастающих в сухом и жарком климате, таких как кукуруза и сахарный тростник, имеется специфический адаптивный механизм. У этих растений реакции цикла фиксации углерода, показанные на рис. 7-43, протекают только в хлоропластах специализированных клеток

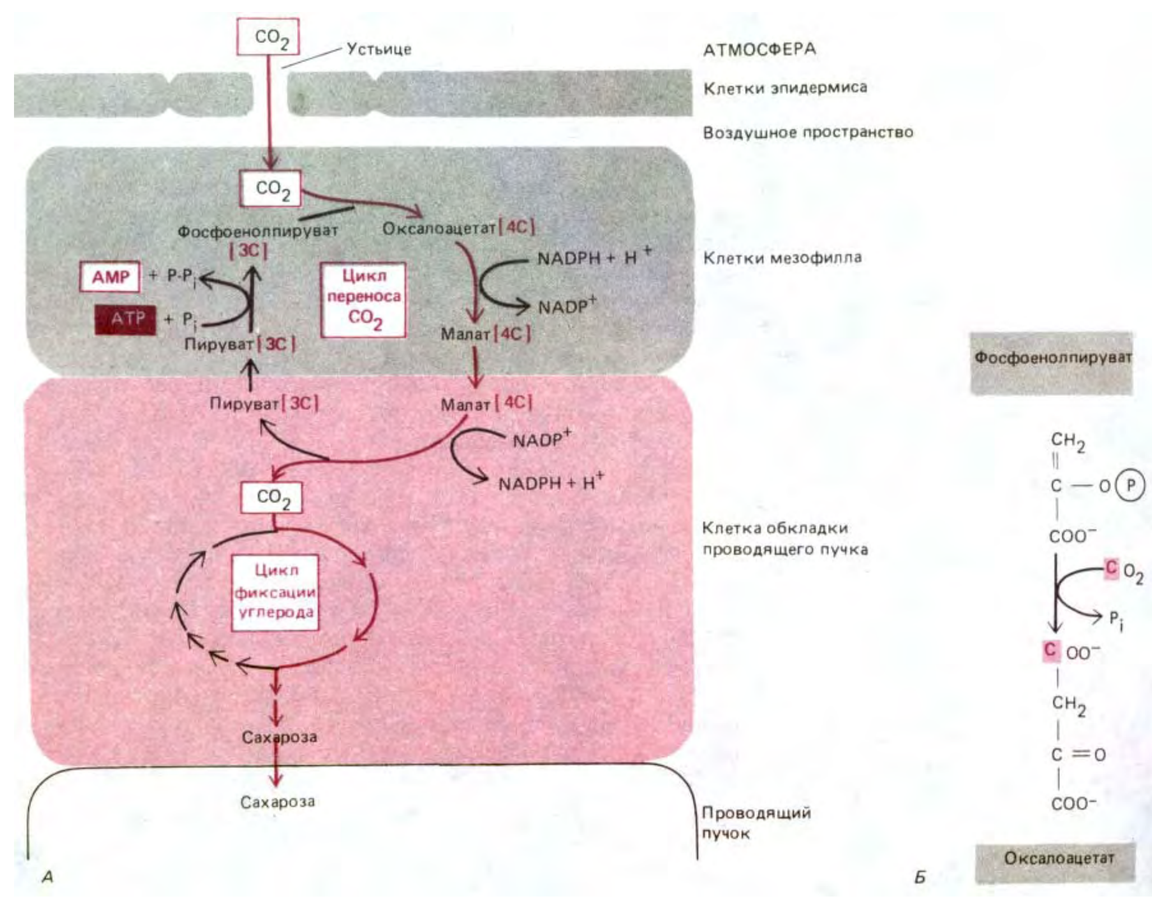


Рис. 7-44. Цикл транспортирования CO_2 у таких растений, как кукуруза. *А.* Образование углеводов происходит только в клетках обкладки проводящего пучка, где находится вся рибулозобисфосфат-карбоксилаза. Цикл перемещения CO_2 начинается в клетках мезофилла; в реакциях цикла участвуют четырех- и трехуглеродные соединения, указанные на схеме. Варианты такого цикла встречаются и в других CO_2-транспортирующих растениях. *Б.* Взаимодействие фосфоенолпирувата с CO_2 в клетках мезофилла.

в *обкладке проводящего пучка,* в которых содержится вся рибулозобисфосфат-карбоксилаза. Эти клетки защищены от воздуха и окружены слоем клеток мезофилла, «перекачивающих» CO_2 в клетки обкладки и тем самым создающих для рибулозобисфосфат-карбоксилазы высокую концентрацию CO_2, которая сильно подавляет фотодыхание.

«Насосом» для перекачки CO_2 служит цикл реакций, начинающийся фиксацией CO_2 в цитозоле клеток мезофилла при участии фермента, обладающего высоким сродством к двуокиси углерода (в виде бикарбоната). Образующееся четырехуглеродное соединение переносится в обкладку проводящего пучка и расщепляется там на одну молекулу CO_2 и одну трехуглеродную молекулу. Последняя снова переходит в клетки мезофилла, где в ходе реакции, требующей гидролиза АТР, превращается в активную форму, способную присоединить следующую молекулу CO_2 и вновь повторить цикл транспортировки CO_2 (рис. 7-44).

Путем импульсного введения растению с таким CO_2-насосом радиоактивной $^{14}CO_2$ было установлено, что первое меченое органическое вещество, появляющееся в мезофилле в результате ассимиляции $^{14}CO_2$, содержит четыре углеродных атома, тогда как в других растениях оно оказывалось трехуглеродным (см. рис. 7-43). По этой причине транспортирующие CO_2 виды называют *C_4-растениями,* а все остальные - *C_3-растениями* (рис. 7-45).

Подобно всякому направленному транспортному процессу, перенос CO_2 в клетки обкладки проводящего пучка требует затрат энергии. В жарких, сухих условиях эти затраты часто бывают намного меньше потерь от фотодыхания, происходящего в C_3-растениях, поэтому

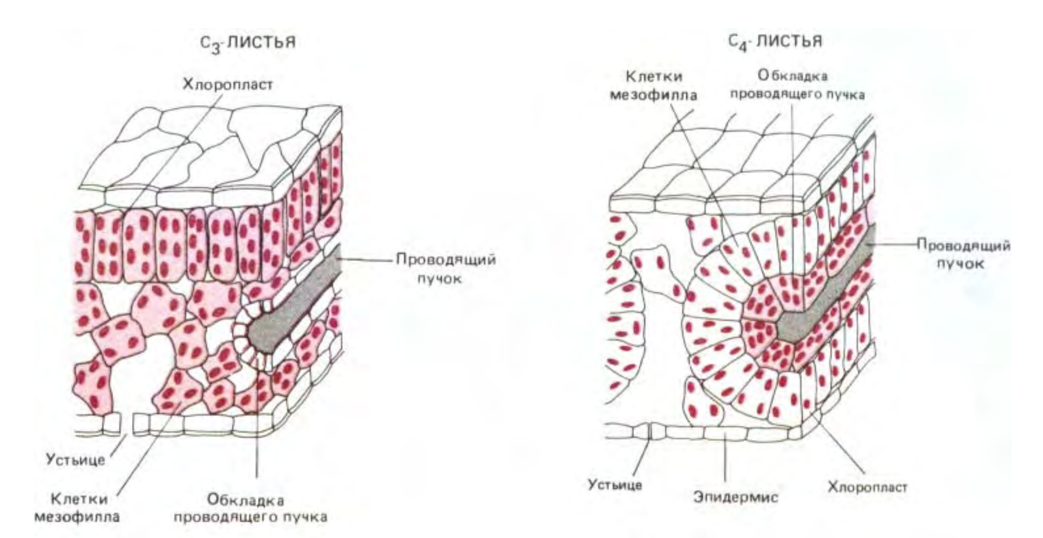


Рис. 7-45. Сравнение анатомического строения листьев у C_3-растений и C_4-растений. В обоих случаях клетки, хлоропласты которых осуществляют нормальный цикл фиксации углерода, выделены цветом. В C_4-растениях клетки мезофилла специализированы для активной транспортировки CO_2, а не для фиксации углерода; именно эти клетки создают высокое отношение CO_2:O_2 в клетках обкладки проводящего пучка. Только в этих клетках у таких растений происходит цикл фиксации углерода (см. рис. 7-44). По проводящим пучкам образовавшаяся в листе сахароза поступает во все остальные ткани растения.

C_4-растения получают здесь преимущество. Кроме того, так как C_4-растения могут осуществлять фотосинтез при низких концентрациях CO_2 внутри листа, они меньше открывают устьица и потому способны фиксировать примерно в два раза больше углерода на единицу потерь воды, чем C_3-растения.

7.3.6. Фотосинтез определяется фотохимией молекулы хлорофилла [31]

Рассмотрев реакции связывания углерода, вернемся теперь к вопросу о том, как в процессе фотосинтетического переноса электронов, протекающем в хлоропласте, образуются ATP и NADH, необходимые для синтеза углевода из CO_2 и H_2O (см. рис. 7-41). Необходимая энергия извлекается из солнечного света, поглощаемого молекулами **хлорофилла** (рис. 7-46). Процесс преобразования энергии начинается с возбуждения молекулы хлорофилла квантом света (фотоном), сопровождающегося переходом электрона на более высокий энергетический уровень. Такая возбужденная молекула нестабильна и стремится вернуться к исходному состоянию одним из трех способов: 1) в результате превращения избыточной энергии в тепло (в молекулярное движение), либо в тепло и свет с большей длиной волны (флуоресценция) в том случае, когда лучистая энергия поглощается отдельной молекулой хлорофилла в растворе; 2) в результате передачи энергии (но не электрона) непосредственно соседней молекуле хлорофилла при помощи процесса, называемого *резонансной передачей энергии;* или 3) путем передачи высокоэнергетического электрона одной из ближайших молекул *(акцептору электрона)* и возвращения в первоначальное состояние в результате принятия низкоэнергетического электрона от какой-то другой молекулы *(донора электрона,* рис. 7-47). Последние два механизма играют ключевую роль в фотосинтезе.

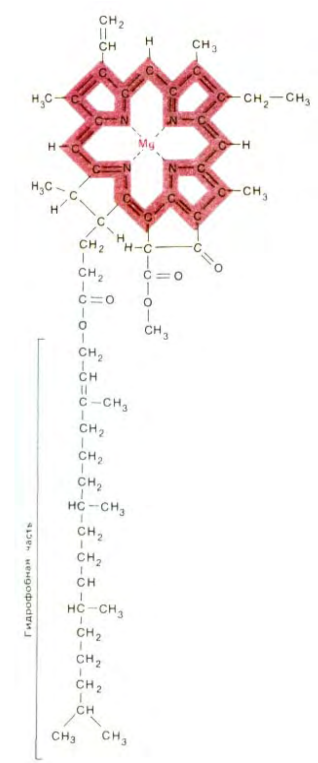


Рис. 7-46. Строение хлорофилла. Атом магния связан в порфириновом кольце, близком по структуре к порфириновому кольцу, связывающему железо в геме (сравните с рис. 7-27). Цветом выделена система сопряженных двойных связей.

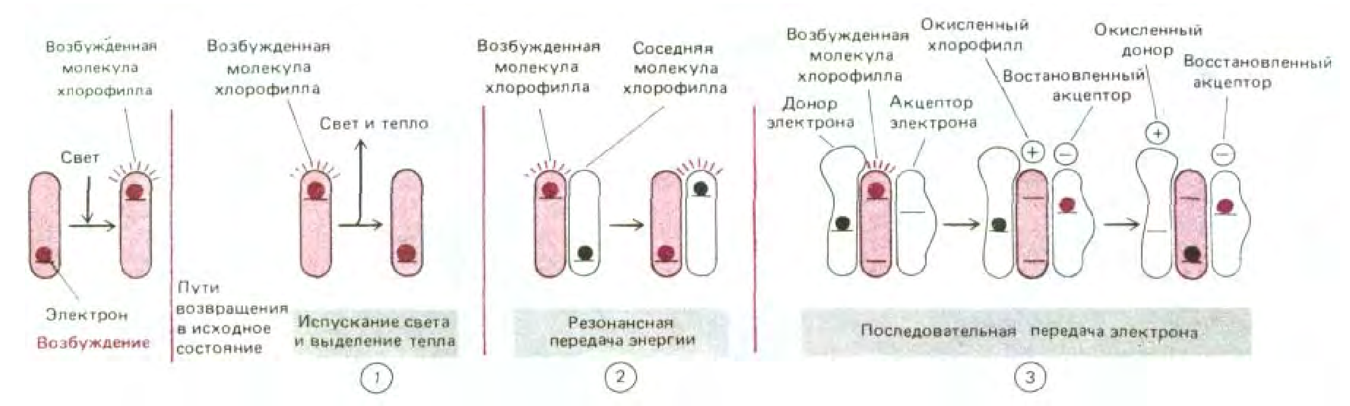


Рис. 7-47. Три возможных пути возвращения активированного хлорофилла (молекулы, содержащей высокоэнергетический электрон) в исходное невозбужденное состояние. В первом случае *(I)* лучистая энергия, поглощенная изолированной молекулой хлорофилла, полностью высвобождается в виде света и тепла. В отличие от этого при фотосинтезе хлорофилл передает свою энергию другой молекуле в антенном комплексе (2) или отдает возбужденный электрон в реакционном центре *(3),* как подробнее описано в тексте.

7.3.7. Фотосистема содержит реакционный центр и антенный комплекс [32]

Фотосистемами называют состоящие из множества белков комплексы, которые катализируют преобразование энергии света через энергию возбужденных молекул хлорофилла в биологически полезные формы. Фотосистема содержит два тесно связанных компонента: *фотохимический реакционный центр* и *антенный комплекс* (рис. 7-48).

Антенный комплекс необходим для улавливания света. В хлоропластах он представляет собой скопление нескольких сотен молекул хлорофилла, связанных между собой белками, которые прочно удерживают эти молекулы в тилакоидной мембране. В зависимости от вида растения в каждом комплексе находятся также дополнительные пигменты - *каротиноиды,* которые способны улавливать свет с другими длинами волн. При возбуждении молекулы хлорофилла в антенном комплексе энергия быстро передается от одной молекулы к другой путем резонансного переноса до тех пор, пока не достигнет двух особых молекул хлорофилла в фотохимическом реакционном центре. Таким образом, каждый антенный комплекс действует как «воронка», со-

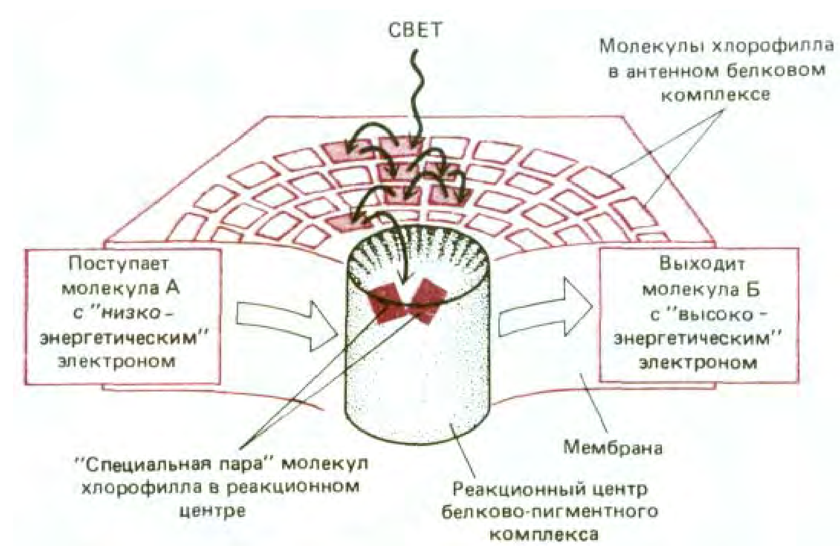


Рис. 7-48. Фотосистема состоит из реакционного центра и антенны. Реакционный центр представляет собой трансмембранный белковый комплекс, удерживающий «специальную пару» молекул хлорофилла в определенном положении относительно других переносчиков электронов (см. рис. 7-49). Реакционный центр катализирует третий процесс, представленный на рис. 7-47. Если рассматривать этот центр как фермент, то его субстратами будут слабый донор электронов (молекула А) и слабый акцептор электронов (молекула Б), а продуктами реакции -сильный акцептор электронов (окисленная молекула А) и сильный донор электронов (восстановленная молекула Б). Антенный комплекс содержит большую часть хлорофилла тилакоидной мембраны и служит как бы воронкой, направляющей энергию возбужденного электрона к реакционному центру. Многие из этих актов переноса энергии происходят между идентичными молекулами хлорофилла, передающими возбуждение случайным образом (процесс 2 на рис. 7-47). Однако средний промежуток времени между поглощением возбуждающего кванта и передачей возбуждения в реакционный центр составляет всего лишь 10^{-10}-10^{-9} с, так что в результате бесполезного процесса 1 теряется очень небольшая доля поглощенных

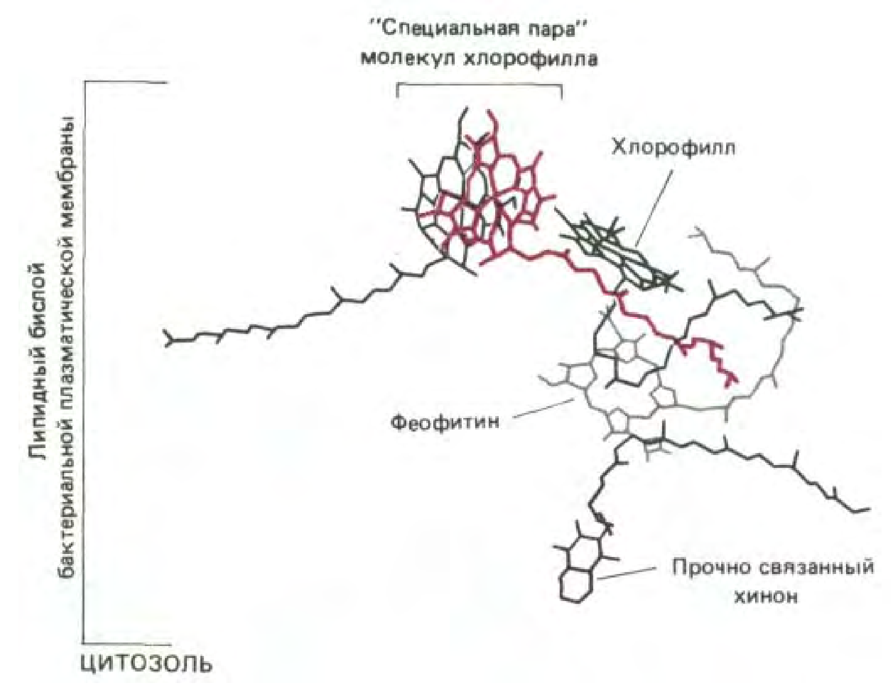


Рис. 7-49. Расположение переносчиков электронов в фотохимическом реакционном центре бактерий, установленное путем рентгеноструктурного анализа. Изображенные молекулы пигмента удерживаются внутри трансмембранного белка и окружены липидным бислоем. От хлорофилла антенного комплекса возбуждение передается электрону специальной пары молекул хлорофилла с помощью резонансного механизма (процесс 2 на рис. 7-47), а затем происходит перенос возбужденного электрона от специальной пары молекул хлорофилла на хинон (через ряд промежуточных этапов, см. рис. 7-50).

бирающая энергию и направляющая ее к специальным участкам, где она может быть использована наиболее эффективно (рис. 7-48).

Фотохимический реакционный центр это трансмембранный белково-пигментный комплекс, составляющий самое «сердце» фотосинтеза. Полагают, что этот комплекс впервые появился у примитивных фотосинтезирующих бактерий более 3 млрд. лет назад. Особая пара молекул хлорофилла в реакционном центре действует как надежная ловушка для энергии возбуждения благодаря тому, что реакционно-способные электроны этих молекул прямо передаются в цепь акцепторов, расположенных в непосредственной близости к хлорофиллу в том же самом белковом комплексе (рис. 7-49). Быстро удаляя высокоэнергетический электрон от хлорофилла, реакционный центр передает его близлежащим молекулам, в которых электрон может находиться в гораздо более стабильном состоянии. Тем самым электрон становится доступным для последующих фотохимических реакций, протекание которых требует времени. Как мы увидим, суммарный результат этих более медленных реакций заключается в том, что низкоэнергетический электрон в составе слабого донора электронов (такого, как вода) становится высокоэнергетическим в составе сильного донора (такого, как *хинон)*.

7.3.8. Лучистая энергия, поглощенная хлорофиллом реакционного центра, используется для замены слабого донора электронов сильным [33]

Процессы переноса электронов в только что описанных фотохимических реакциях интенсивно изучались с помощью методов скоростной спектроскопии, особенно в фотосистеме пурпурных бактерий, более простой, чем эволюционно близкая к ней фотосистема хлоропластов. Реакционные центры бактерий можно солюбилизировать и выделить в активной форме с помощью детергента. Это крупные белково-пигментные комплексы, и в 1985 г. методом рентгеноструктурного анализа удалось определить их полную трехмерную структуру (см. рис. 6-72 и 7-49). Эта структура в сочетании с данными кинетики дает наилучшее представление о реакциях переноса электронов, лежащих в основе фотосинтеза.

На рис. 7-50 схематически представлена последовательность этих реакций в реакционном центре пурпурных бактерий. Электрон, возбужденный в результате поглощения света, быстро передается от особой

пары молекул хлорофилла через ряд других пигментов (рис. 7-49) на прочно связанный хинон - акцептор электронов, обозначенный Q_A. В результате этого переноса электрона, происходящего менее чем за 10^{-9} с и практически необратимого, в хлорофилле образуется положительно заряженная «дырка», обладающая очень высоким сродством к электронам. В результате захвата электрона от ближайшего цитохрома (в норме слабого донора электронов) эта «дырка» заполняется. Затем высокоэнергетический электрон, удерживаемый Q_A, переходит на второй хинон, Q_B, после чего покидает реакционный центр и переходит на подвижную молекулу хинона (Q) в фотосинтетической мембране. Будучи восстановлен, этот хинон служит сильным донором электронов, восстановительная способность которого может использоваться для перемещения протонов.

Основной принцип описанного процесса заключается в том, что фотосистема дает возможность использовать энергию света для переноса электрона от слабого донора электронов, т. е. молекулы, имеющей большое сродство к электронам (в данном случае от цитохрома), на такую молекулу, как хинон, который в восстановленной форме служит сильным донором электронов. Таким образом, энергия возбуждения, которая в обычных условиях рассеялась бы в виде тепла и/или флуоресценции, используется для повышения энергии электрона и образования сильного донора электронов. Как мы увидим, в хлоропластах высших растений начальным донором электронов служит не цитохром, а вода, чем и объясняется выделение кислорода при фотосинтезе у растений. Прежде чем перейти к рассмотрению процессов, происходящих в более сложной фотосистеме хлоропластов и доставляющих в конечном результате энергию для синтеза ATP и NADPH, посмотрим, как эти конечные продукты образуются у пурпурных бактерий с помощью менее сложного, но похожего механизма.

7.3.9. В процессе бактериального фотосинтеза на плазматической мембране создается электрохимический протонный градиент, энергия которого используется для синтеза как ATP, так и NADPH [34]

Энергия электронов, переносимых восстановленным хиноном, используется в плазматической мембране пурпурных бактерий двумя раз-

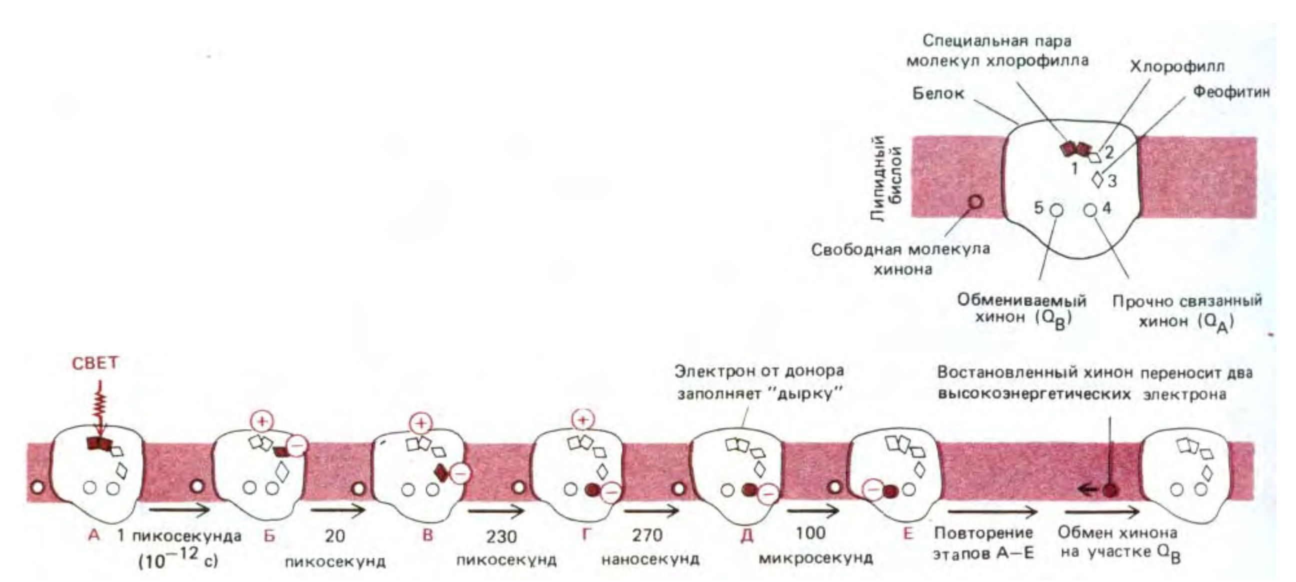


Рис. 7-50. Перенос электронов, происходящий в фотохимическом реакционном центре пурпурных бактерий. Полагают, что сходная цепь реакций осуществляется и в эволюционно близкой фотосистеме II у растений. Вверху справа схематично представлены молекулы, переносящие электроны, - те, что изображены на рис. 7-49, и, кроме того, обмениваемый хинон (Q_B) и подвижный хинон Q, растворенный в липидном бислое. Переносчики электронов *1-5* определенным образом связаны с трансмембранным белком, который состоит из 596 аминокислотных остатков, образующих две отдельные субъединицы (см. рис. 6-32). После возбуждения световым фотоном богатый энергией электрон переходит с одной молекулы пигмента на другую, и это ведет к разделению зарядов, что показано на рисунке внизу (стадии *В-Д;* молекулы пигмента, несущие высокоэнергетические электроны, выделены цветом.) Перейдя в липидный бислой, хинон с двумя электронами захватывает два протона и утрачивает свой заряд (см. рис. 7-30).

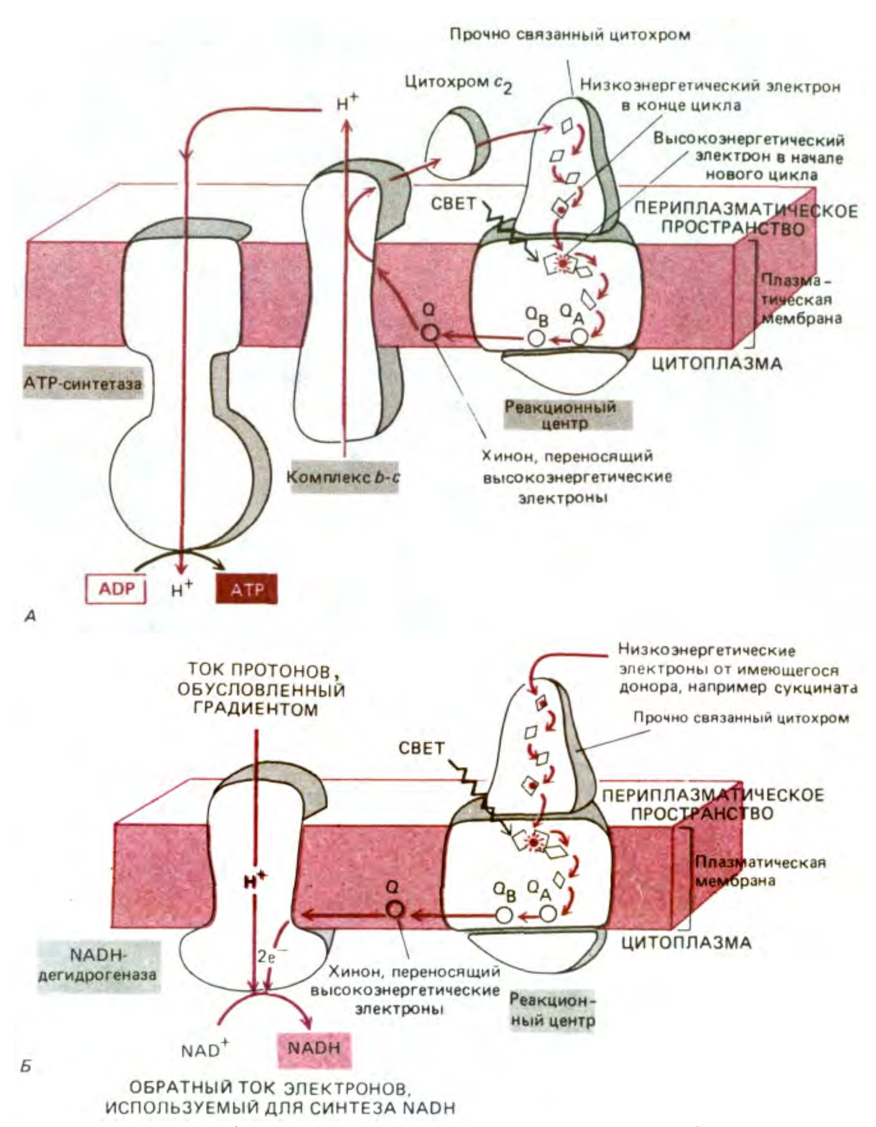


Рис. 7-51. Две реакции переноса электронов в фотосинтетической системе пурпурных бактерий. Эти реакции протекают в плазматической мембране, а цитохром c_2 находится в растворимой форме в периплазматическом пространстве под наружной мембраной (см. рис. 6-54). *А. В* результате циклического потока электронов на плазматической мембране создается электрохимический протонный градиент. Энергия этого градиента используется АТР-синтетазой для синтеза АТР в бактериальной плазматической мембране. *Б.* Обратный поток электронов через NADH-дегидрогеназу, осуществляемый за счет энергии того же протонного градиента, используется для синтеза NADH.

личными способами для двух целей - для синтеза АТР и образования NADPH. АТР синтезируется с помощью механизма, включающего перекачку протонов и похожего на тот, с которым мы уже познакомились, рассматривая митохондрии (разд. 7.1.8): протоны перемещаются через плазматическую мембрану бактерии в результате переноса высокоэнергетических электронов хиноном на *комплекс* b-c_1, встроенный в эту мембрану. Комплекс b-c_1 передает затем свои электроны на растворимый цитохром, от которого электроны (теперь уже с низкой энергией), пройдя через другой, прочно связанный цитохром, вновь попадают в реакционный центр, завершая таким образом циклический процесс (рис. *1-51, А)*.

NADPH образуется в ходе второго электронтранспортного процесса, в котором высокоэнергетические электроны переходят от хинона не на комплекс b-c_1, а на NAD. Образующийся при этом NADH превращается затем с помощью трансгидрогеназы в NADPH. Так как переносимые

хиноном высокоэнергетические электроны находятся на более низком энергетическом уровне, чем электроны в NADH (напомним, что в митохондриях электроны переносятся с NADH на хинон, а не наоборот - см. рис. 7-34), образование NADH из NAD требует затраты энергии. У пурпурных фотосинтезирующих бактерий электрохимический протонный градиент, создаваемый на плазматической, мембране, заставляет протоны возвращаться в клетку через NADH-дегидрогеназный комплекс, снабжая этот комплекс энергией, необходимой для обратного переноса электронов от хинона на NAD (рис. 7-5*1, Б).*

Таким образом, в плазматической мембране пурпурных бактерий реакционные центры используются для создания большого пула восстановленных молекул. Часть этих молекул обеспечивает создание на плазматической мембране значительного электрохимического протонного градиента. За счет энергии этого градиента осуществляются два процесса: 1) синтез АТР с помощью АТР-синтетазы и 2) создание обратного потока электронов от остальной части восстановленного хинона на NAD, в результате чего генерируется восстановительная сила, необходимая для синтеза органических молекул.

7-24;
7-25;
7-26

7.3.10. У растений и цианобактерий в результате нециклического фотофосфорилирования образуются как NADPH, так и АТР [31, 35]

Наиболее сложен фотосинтез у растений и цианобактерий. Здесь в двухступенчатом процессе, называемом **нециклическим фотофосфорилированием,** сразу образуются и АТР, и NADPH. Благодаря тому что две фотосистемы последовательно возбуждают электрон, последний способен пройти весь путь от воды до NADPH. По мере прохождения высокоэнергетических электронов через сопряженные фотосистемы часть заключенной в электронах энергии генерирует NADPH, а часть отводится на синтез АТР.

В первой из двух фотосистем, по историческим причинам получившей название *фотосистемы II,* кислород двух молекул воды связывается группой атомов магния при участии плохо изученного фермента, расщепляющего воду. Извлекаемые по одному электроны сразу же заполняют образовавшиеся под действием света «дырки» в хлорофилле реакционного центра. Как только четыре электрона извлечены (для этого требуются четыре кванта света), фермент освобождает O_2; таким образом, фотосистема II катализирует реакцию $2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$.

«Ядро» реакционного центра в фотосистеме II гомологично только что описанному бактериальному реакционному центру и точно так же генерирует сильные доноры электронов в форме восстановленных молекул хинона в мембране. Эти молекулы передают электроны на *комплекс b_6 - f,* сходный с бактериальным комплексом *b-c* и комплексом *b - c_1* в дыхательной цепи митохондрий. Как и в митохондриях, комплекс *b_6 - f* перекачивает протоны через тилакоидную мембрану в тилакоидное пространство (в хлоропластах) или из цитозоля через впячивания плазматической мембраны (у цианобактерий), и создающийся при этом электрохимический градиент доставляет энергию для синтеза АТР АТР-синтетазой (рис. 7-52 и 7-53). Конечным акцептором в этой цепи переноса электронов служит вторая фотосистема **(фотосистема** I), принимающая электроны в «дырки», образовавшиеся под действием света в хлорофилле ее реакционного центра. В то время как электроны, активированные фотосистемой II, имеют слишком низкую энергию,

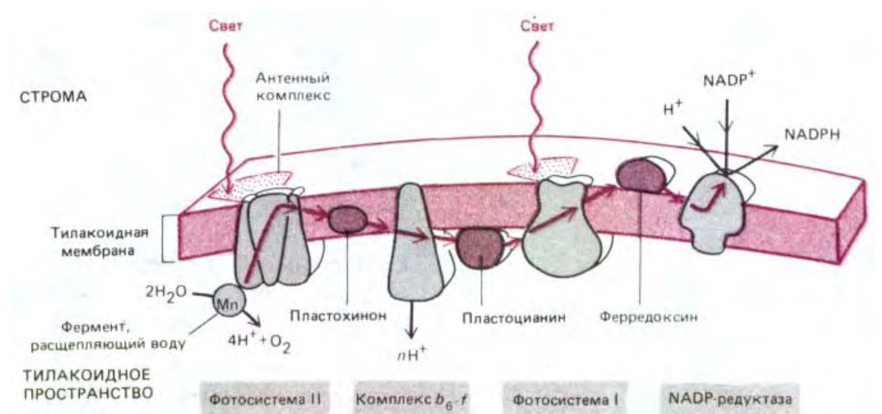


Рис. 7-52. Перенос электронов в процессе фотосинтеза в тилакоидной мембране. Подвижными переносчиками электронов в этой цепи служат пластохинон (очень сходный с убихиноном митохондрий), пластоцианин (небольшой медьсодержащий белок) и ферредоксин (небольшой белок, содержащий железо-серный центр). Комплекс b_6-f очень похож на комплекс b-c_1 митохондрий и комплекс b-c бактерий (см. рис. 7-63): все три комплекса принимают электроны от хинонов и перекачивают протоны. Обратите внимание, что протоны, высвобождаемые при окислении воды, и протоны, захватываемые при образовании NADPH, тоже участвуют в создании электрохимического протонного градиента, доставляющего энергию для синтеза ATP.

чтобы перейти на $NADP^+$, каждый электрон, покидающий фотосистему I, находится на очень высоком энергетическом уровне благодаря последовательной активации двумя квантами света. В результате эти электроны способны перейти на железо-серный центр ферредоксина и восстановить $NADP^+$ до NADPH (рис. 7-53); при этом из среды извлекается один протон.

Зигзагообразную схему фотосинтеза, показанную на рис. 7-53, называют **Z-схемой.** В результате двух отдельных этапов возбуждения, каждый из которых катализируется своей фотосистемой, электрон передается от воды, обычно прочно удерживающей свои электроны (редокс-потенциал + 820 мВ), на NADPH, который имеет довольно слабое сродство к электронам (редокс-потенциал — 320 мВ). Один квант видимого света не способен сообщить электрону достаточно энергии для прохождения всего пути от начала фотосистемы II до конца фотосистемы

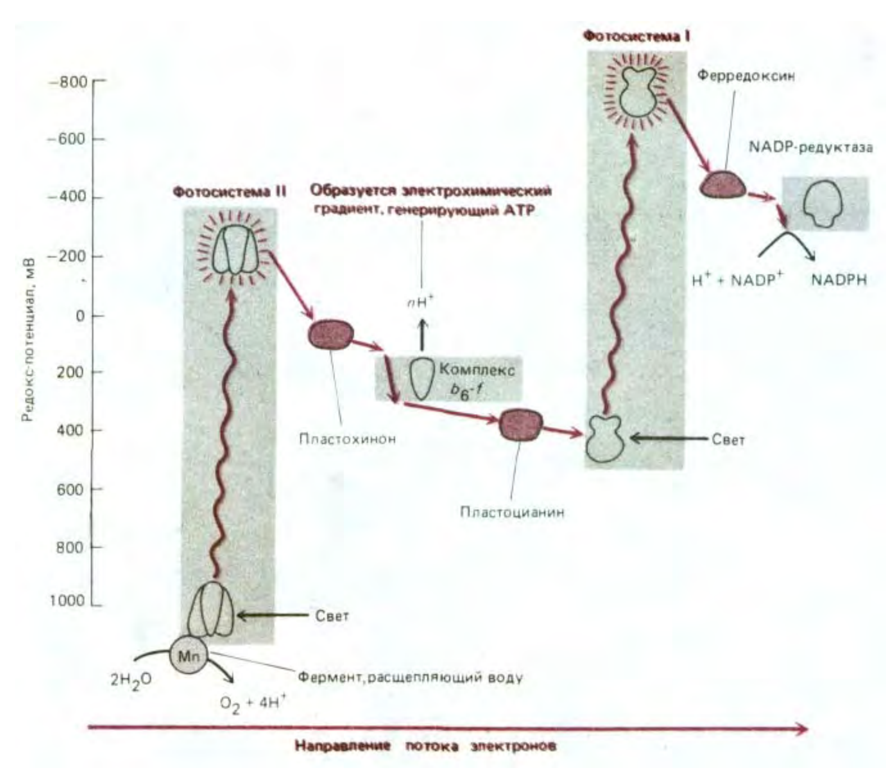


Рис. 7-53. Изменения редокс-потенциала при прохождении электронов в процессе фотосинтеза с образованием NADPH и ATP у растений и цианобактерий. Фотосистема II очень похожа на реакционный центр пурпурных бактерий (см. рис. 7-50), с которым она эволюционно связана. Фотосистема I отличается от этих двух систем: как полагают, она эволюционно родственна фотосистемам другой группы прокариот - зеленых бактерий. В фотосистеме I электроны возбужденного хлорофилла проходят через ряд прочно связанных железо-серных центров. Две последовательно соединенные фотосистемы обеспечивают суммарный поток электронов от воды к $NADP^+$ с образованием NADPH. Кроме того, образуется ATP с помощью ATP-синтетазы (не показана) за счет энергии электрохимического протонного градиента, который создается электронтранспортной цепью, связывающей фотосистему II с фотосистемой I. Эту *Z-схему* образования ATP называют *нециклическим фосфорилированием* в отличие от циклической схемы, представленной на рис. 7-54 (см. также рис. 7-52).

I; видимо, для этого нужно столько энергии, сколько требуется для переноса электрона с воды на NADP $^{+}$. Кроме того, использование двух отдельных следующих друг за другом фотосистем позволяет связать их электронтранспортной цепью, в которой энергия электронов будет достаточна для перемещения H^+ через тилакоидную мембрану (или плазматическую мембрану цианобактерий), и тем самым -направить часть возбуждаемых светом электронов на синтез АТР.

7.3.11. В процессе циклического фотофосфорилирования хлоропласты могут синтезировать АТР без образования NADPH [31, 36]

При нециклическом фотофосфорилировании, рассмотренном выше, высокоэнергетические электроны, покидающие фотосистему II, обеспечивают синтез АТР, тогда как энергия электронов, выходящих из фотосистемы I, расходуется на образование NADPH. При этом на одну пару электронов, переходящих с H_2O на $NADP^+$ с образованием молекулы NADPH, синтезируется немногим больше одной молекулы АТР. Однако для фиксации углерода АТР нужен в значительно большем количестве, чем NADPH (см. рис. 7-43). Для получения дополнительного АТР хлоропласты могут переводить фотосистему I на циклический режим работы, при котором энергия системы направляется не на синтез NADPH, а на образование АТР. В этом процессе, называемом **циклическим фотофосфорилированием,** участвует поток электронов, во многом сходный с тем, энергию которого используют фотосинтезирующие бактерии для получения АТР (см. рис. 7-51, *А).* При этом высокоэнергетические электроны, активированные фотосистемой I, не переходят к NADP $^{+}$, а возвращаются на комплекс b_6-f, вызывая тем самым перемещение протонов через тилакоидную мембрану. Создающийся в результате электрохимический градиент доставляет энергию для синтеза АТР (рис. 7-54).

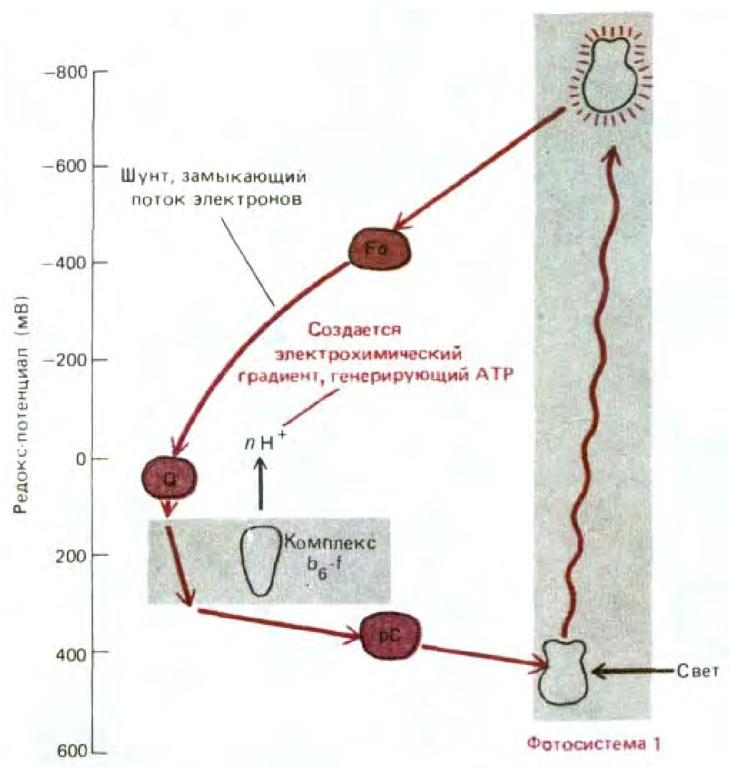


Рис. 7-54. Путь переноса электронов при циклическом фосфорилировании. Этот путь позволяет синтезировать только АТР, без образования NADPH и O_2. Будет ли поток электронов нециклическим или циклическим, зависит от того, куда будет передавать свои реакционно-способные электроны ферредоксин - на $NADP^+$, как показано на рис. 7-53, или на компоненты, ведущие обратно к комплексу b_6-f. Всякий раз, когда происходит накопление NADPH и соответственно снижается уровень $NADP^+$, создаются благоприятные условия для протекания фотосинтеза по циклической схеме. Другие, менее прямые регуляторные механизмы тоже обеспечивают образование при фотосинтезе АТР и NADPH в надлежащей пропорции. Ф —ферредоксин; ПХ - пластохинон; ПЦ - пластоцианин.

Итак, процесс нециклического фотофосфорилирования, включающий восстановление $NADP^+$ с участием воды как донора электронов, осуществляется при совместном действии фотосистем I и II, и в результате образуются NADPH, ATP и O_2. В отличие от этого при циклическом фотофосфорилировании, в котором участвует только фотосистема I, синтезируется один лишь ATP - образования NADPH и O_2 не происходит. Таким образом, относительная интенсивность циклического и нециклического переноса электронов будет определять, какая доля световой энергии пойдет на образование восстановительной силы (NADPH) и какая превратится в энергию фосфатных связей (ATP). Этот баланс регулируется в соответствии с потребностью в NADPH. Будет ли поток электронов циклическим или нет, зависит от того, куда будет передавать свои реакционноспособные электроны ферредоксин - на $NADP^+$ или на компоненты, ведущие обратно к комплексу b_6-f (сравните рис. 7-53 и 7-54). При низких концентрациях $NADP^+$, обусловленных накоплением NADPH, будет преобладать циклический процесс, приводящий к синтезу ATP.

Влияние уровня NADPH на циклическое фотофосфорилирование - это лишь часть обширной регуляторной сети, контролирующей активность фотосистем I и II. Например, избыточная активность фотосистемы II приводит к повышению соотношения восстановленного и окисленного хинона в тилакоидной мембране, а чрезмерная активность фотосистемы II - к противоположному эффекту (см. рис. 7-53). Однако всякий раз, когда соотношение восстановленного хинона к окисленному превысит определенное пороговое значение, активируется протеинкиназа, фосфорилирующая главный светоулавливающий пигментный белок в антенном комплексе. Это способствует отделению антенного комплекса от фотосистемы и даже переходу его из области локализации фотосистемы II (граны) в тилакоидную мембрану, где сконцентрированы компоненты фотосистемы I. В результате фотосистема I получает большую долю лучистой энергии, до тех пор пока уровень хинонов не возвратится к норме.

7-27

7.3.12. Геометрия перемещения протонов в митохондриях и в хлоропластах сходна [37]

Наличие в хлоропластах третьего внутреннего компартмента-тилакоидного пространства - на первый взгляд сильно отличает их от митохондрий. Однако геометрия перемещения протонов в этих двух органеллах очень сходна. Как видно из рис. 7-55, в хлоропластах протоны откачиваются из стромы (pH 8) в тилакоидное пространство (pH около 5), создавая градиент в 3-3,5 единицы pH. Это создает на тилакоидной мембране протонодвижущую силу около 200 мВ (почти целиком обусловленную градиентом pH, а не мембранным потенциалом), за счет которой мембранная ATP-синтетаза осуществляет синтез ATP.

В митохондриальном матриксе, так же как и в строме хлоропласта, величина pH близка к 8, но она создается за счет переноса протонов из органеллы в цитозоль (pH около 7), а не в какой-то ее внутренний компартмент. Поэтому градиент pH относительно мал и протонодвижущая сила на внутренней митохондриальной мембране, близкая к такой же силе на тилакоидной мембране хлоропласта, в основном создается за счет суммарного мембранного потенциала (см. разд. 7.1.7). Однако и в митохондриях, и в хлоропластах каталитический участок ATP-синтетазы находится в большом компаргменте органеллы (соответственно в матриксе и в строме), который имеет pH около 8,0

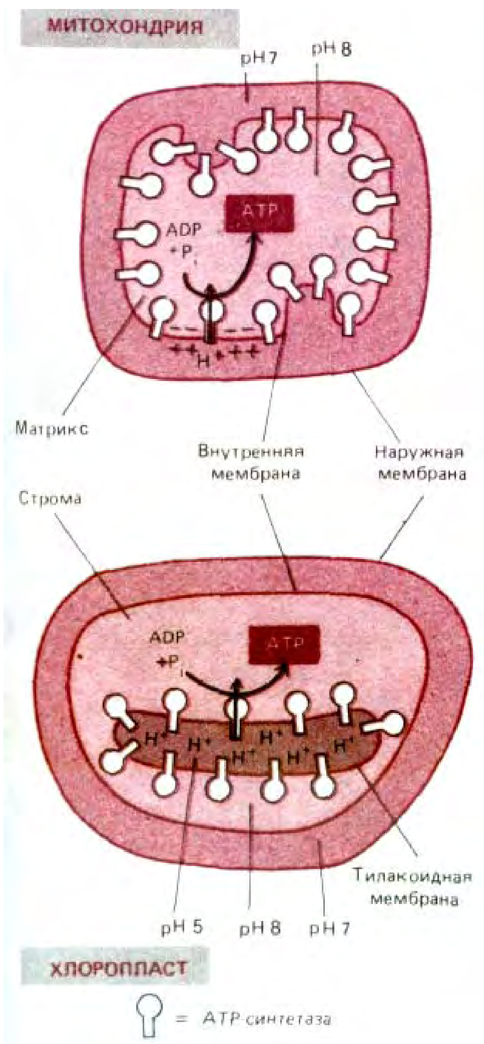


Рис. 7-55. Сравнение потока протонов и ориентации ATP-синтетазы в митохондриях и хлоропластах. Компартменты со сходным pH окрашены одинаково. Протонодвижущая сила на тилакоидной мембране почти полностью обусловлена градиентом pH; высокая проницаемость этой мембраны для ионов Mg^{2+} и Cl^- позволяет потоку этих ионов рассеивать большую часть мембранного потенциала. Как полагают, митохондрии не могли бы выдержать такое защелачивание (до pH 10), какое потребовалось бы для создания протонодвижущей силы без участия мембранного потенциала.

и заполнен растворимыми ферментами. Поэтому именно здесь образуется весь ATP органеллы (рис. 7-55).

Несмотря на эти черты сходства между митохондриями и хлоропластами, последние устроены таким образом, что происходящие в них процессы переноса электронов и протонов более доступны для изучения, чем в митохондриях. Разрушив внутреннюю и наружную мембраны хлоропластов, можно выделить неповрежденные тилакоидные диски. Они сходны с субмитохондриальными частицами: компоненты электронтранспортной цепи, использующие $NADP^+$, ADP и фосфат, тоже расположены здесь с внешней стороны мембраны. Однако тилакоиды представляют собой интактные естественные структуры и потому гораздо более активны, чем субмитохондриальные частицы, получаемые из митохондрий искусственным путем. Поэтому некоторые из экспериментов, впервые доказавших ключевую роль хемиосмотического механизма, были проведены на хлоропластах, а не на митохондриях.

7.3.13. Внутренняя мембрана хлоропласта, подобно внутренней мембране митохондрии, содержит белки-переносчики, облегчающие обмен метаболитами с цитозолем [38]

Хотя электрон- и протонтранспортирующие реакции фотосинтеза легче всего изучать на препаратах хлоропластов, у которых внутренняя и наружная мембраны разрушены и удалены, такие хлоропласты не способны к фотосинтетической фиксации CO_2 из-за отсутствия ряда важных веществ, в нормальных условиях имеющихся в строме. Но хлоропласты можно выделить и так, что их внутренняя мембрана останется неповрежденной. На таких препаратах можно показать, что внутренняя мембрана обладает избирательной проницаемостью и, значит, содержит специальные белки-переносчики. Например, значительная часть глицеральдегид-3-фосфата, образующегося в строме при фиксации углерода, выводится из хлоропластов с помощью эффективной системы антипорта, обменивающей трехуглеродные фосфосахара на неорганический фосфат.

Глицеральдегид-3-фосфат, в изобилии поступающий в цитозоль, используется клеткой как исходный материал для биосинтеза многих других веществ, включая сахарозу, предназначенную на «экспорт». Кроме того, попав в цитозоль, глицеральдегид-3-фосфат легко превращается (в результате некоторых реакций цепи гликолиза) в 3-фосфоглицерат с образованием одной молекулы ATP и одной молекулы NADH (в ходе такой же двустадийной реакции, но идущей в обратном направлении, в цикле фиксации углерода образуется глицеральдегид-3-фосфат - см. рис. 7-43). Таким образом, глицеральдегид-3-фосфат, транспортируемый из хлоропластов, служит не только главным источником связанного углерода, но также доставляет NADPH и ATP для клеточного метаболизма за пределами хлоропласта.

7.3.14. Хлоропласты осуществляют и другие биосинтетические реакции [39]

Помимо фотосинтеза в хлоропластах осуществляется много других биосинтетических процессов. Например, все жирные кислоты клетки и ряд аминокислот образуются с помощью ферментов, находящихся в строме. Кроме того, в хлоропластах происходит восстановление нитрита (NO_2^-) до аммиака (NH_3) за счет энергии электронов, активированных светом; в растениях этот аммиак служит источником азота для синтеза аминокислот и нуклеотидов. Таким образом, значение хлоропластов для метаболизма растений и водорослей не ограничивается их ролью в фотосинтезе.

Заключение

Хлоропласты и фотосинтезирующие бактерии получают высокоэнергетические электроны с помощью фотосистем, улавливающих электроны, возбуждаемые солнечным светом, который поглощается молекулами хлорофилла. В состав фотосистем входит антенный комплекс, связанный с фотохимическим реакционным центром, где в строго определенном порядке расположены белки и пигменты, участвующие в фотохимических реакциях фотосинтеза. До сих пор лучше всего изучен реакционный центр пурпурных фотосинтезирующих бактерий - известна его полная трехмерная структура. У *этих бактерий единственная фотосистема создает электрохимический градиент, энергия которого используется для синтеза как ATP, так и NADPH. В хлоропластах и у цианобактерий имеются две фотосистемы. В зависимости от нужд клетки в разных соотношениях осуществляются электронные потоки двух типов: I) нециклический поток, создаваемый при участии двух последовательно соединенных фотосистем, переносит электроны с воды на* $NADP^+$ *с образованием NADPH, причем попутно синтезируется и ATP; 2) циклический поток, поддерживаемый лишь одной фотосистемой, передающей электроны по замкнутой цепи, приводит к образованию только ATP. В хлоропластах все электронтранспортные процессы происходят в тилакоидной мембране: для синтеза ATP протоны накачиваются в тилакоидное пространство и затем в результате обратного тока протонов через ATP-синтетазу в строме образуется ATP.*

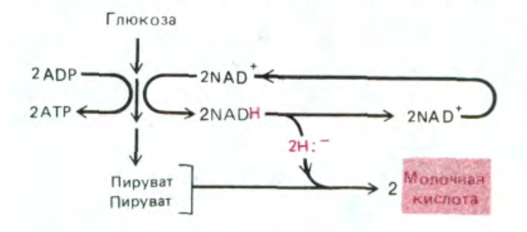
Получаемые при фотосинтезе ATP и NADPH служат источниками энергии для многих биосинтетических реакций, происходящих в строме, в том числе для жизненно важного цикла фиксации CO_2*, в котором из* CO_2 *образуются углеводы. Эти углеводы в виде трехуглеродных фосфосахаров переносятся в цитозоль клетки, где служат источником органического углерода, ATP и восстановительной силы.*

7.4. Эволюция электронтранспортных цепей [40]

Структуру, функцию и эволюцию клеток и организмов в значительной мере можно связать с их потребностью в энергии. Мы уже видели, что механизмы использования таких разных источников энергии, как свет и окисление глюкозы, в основе своей одинаковы. По-видимому, эффективный способ синтеза ATP появился еще на ранних этапах эволюции и с тех пор подвергся лишь незначительным изменениям. Как же впервые возникли ключевые компоненты электронтранспортной цепи - ATP-синтетаза, протонные насосы, использующие энергию окислительно-восстановительных процессов, и фотосистемы? Гипотезы о событиях, происходивших в ходе эволюции, проверить трудно. Однако ключи к разгадке можно найти как в различных примитивных электронтранспортных цепях, сохранившихся у некоторых современных бактерий, так и в геологических данных относительно условий, существовавших на Земле миллиарды лет назад.

7.4.1. Древнейшие клетки, вероятно, синтезировали ATP с помощью процессов брожения [41]

Как уже говорилось в гл. 1, полагают, что первые живые клетки возникли примерно $3{,}5 \cdot 10^9$ лет назад, когда возраст Земли составлял свыше 10^9 лет. Поскольку в окружающей среде отсутствовал кислород, а органические молекулы, образовавшиеся в ходе геохимических процессов, имелись в избытке, самые первые метаболические пути синтеза ATP были, по-видимому, сходны с существующими ныне формами брожения.



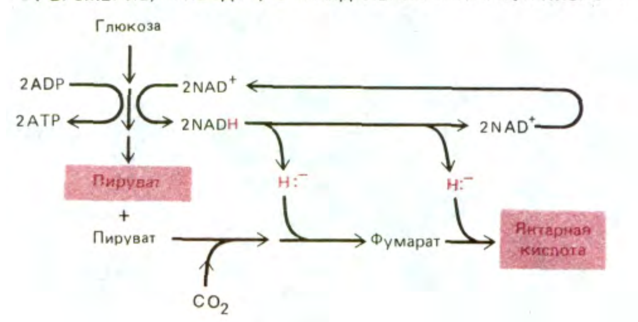


Рис. 7-56. Схемы двух типов брожения (конечные продукты выделены цветом). *А.* Две молекулы NAD^+ , использованные на каждую молекулу глюкозы, подвергшейся гликолизу, регенерируются путем переноса гидрид-иона с NADH на пируват с образованием двух молекул молочной кислоты. Молочная кислота выводится из клетки. *Б.* Две молекулы NAD^+ , израсходованные на каждую молекулу глюкозы при гликолизе, регенерируются путем последовательного переноса гидрид-ионов от двух молекул NADH на соединения, получаемые из пирувата, в результате чего образуется янтарная кислота. На каждую молекулу янтарной кислоты, выводимую из клетки, одна молекула пирувата (выделена цветом) остается в клетке для последующих процессов биосинтеза. В обоих случаях *(А* и *Б)* для регенерации NAD^+ и продолжения гликолиза в анаэробных условиях требуется выведение какой-то органической кислоты.

При **брожении** АТР образуется путем субстратного фосфорилирования (разд. 2.2.2), при котором используется энергия, высвобождаемая в реакциях частичного окисления органических молекул, богатых водородом, таких как глюкоза. В отсутствие кислорода, который мог бы служить акцептором водорода, выделяемый при окислении молекул водород должен переноситься (через NADH или NADPH) на какую-то другую органическую молекулу (или на другую часть той же молекулы), которая при этом восстанавливается. Из органических конечных продуктов брожения один (или несколько) выводится из клетки в окружающую среду как отход метаболизма, а другие, такие как пируват, используются клеткой для биосинтезов.

Разные организмы выделяют разные конечные продукты, но чаще всего это органические кислоты (углеродные соединения с группой COOH). Из наиболее важных продуктов бактериального брожения следует отметить молочную кислоту (которая накапливается и при анаэробном гликолизе в клетках млекопитающих; см. разд. 2.3.2), а также муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную и янтарную кислоты. На рис. 7-56 представлены два типа брожения, встречающиеся у современных бактерий.

7-28

7.4.2. Появление электронтранспортной цепи, запасающей энергию, позволило анаэробным бактериям использовать в качестве источника энергии несбраживаемые органические соединения [42]

Ранние процессы брожения должны были обеспечить образование не только АТР, но и восстанавливающих агентов (NADH и NADPH), необходимых для процессов биосинтеза, и, вероятно, многие из главных метаболических путей сложились в условиях, когда брожение было единственным способом получения энергии. Однако со временем метаболическая активность прокариот должна была изменить окружающую

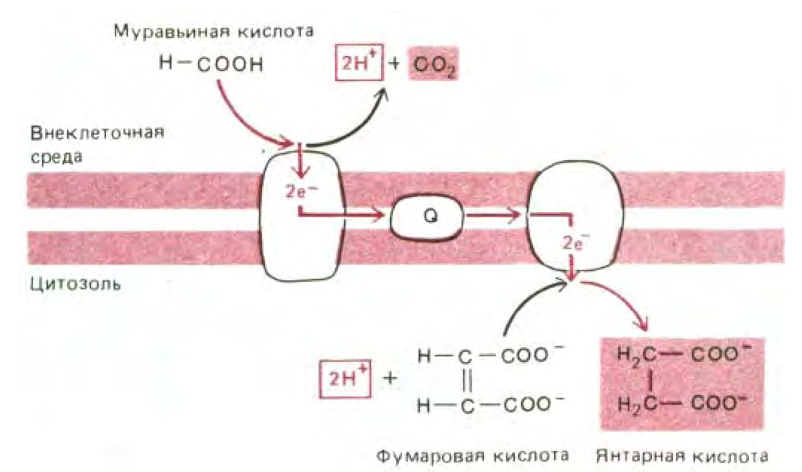


Рис. 7-57. У некоторых современных бактерий, растущих в анаэробных условиях, в том числе у *E.* со/г, окисление муравьиной кислоты фумаратом осуществляется при участии электронтранспортной цепи, находящейся в плазматической мембране. Как показано, в результате этого процесса образуются сукцинат и CO_2. Обратите внимание, что протоны используются внутри клетки, а образуются снаружи, что равнозначно перекачиванию протонов из клетки. Таким образом, эта связанная с мембраной электронтранспортная система может генерировать на плазматической мембране электрохимический протонный градиент. Окислительно-восстановительный потенциал пары муравьиная кислота - CO_2 равен - 420 мВ, а для пары фумарат - сукцинат он составляет + 30 мВ.

среду, и это привело к возникновению новых биохимических путей. Накопление побочных продуктов брожения могло привести к следующим изменениям:

Стадия 1. Из-за непрерывного выделения кислот рН окружающей среды понизился; в результате понадобились трансмембранные насосы, откачивающие ионы H^+ из клетки, чтобы она не погибла от чрезмерного закисления. Вполне возможно, что один из таких насосов использовал энергию гидролиза АТР и, таким образом, мог быть предшественником современной АТР-синтетазы.

Стадия 2. Одновременно с накоплением несбраживаемых органических кислот, которое привело к появлению протонного насоса, использующего энергию АТР, истощались запасы сбраживаемых веществ, за счет окисления которых можно было осуществлять транспорт метаболитов и другие важные жизненные процессы. В этих условиях отбор благоприятствовал тем бактериям, которые были способны выводить ионы H^+ без сопряжения с гидролизом АТР, так что последний сохранялся для других надобностей. Давление отбора, возможно, привело к появлению первых белков, связанных с мембраной, которые могли использовать перенос электронов между молекулами с различным окислительно-восстановительным потенциалом в качестве источника энергии для откачивания протонов через плазматическую мембрану. Для некоторых из этих белков могли найтись подходящие доноры и акцепторы электронов среди накопившихся несбраживаемых органических кислот. Немало таких электронтранспортных белков встречается и у ныне живущих бактерий; например, некоторые бактерии, растущие на средах с муравьиной кислотой, перекачивают протоны за счет относительно небольшой окислительно-восстановительной энергии, извлекаемой при переносе электронов с муравьиной кислоты на фумаровую (рис. 7-57). У других бактерий возникли сходные электронтранспортные механизмы, «занятые» исключительно окислением и восстановлением неорганических субстратов (см., например, рис. 7-59).

Стадия 3. В конце концов у некоторых бактерий выработалась настолько эффективная цепь переноса электронов, что энергии запасалось больше, чем было нужно для поддержания внутриклеточного рН. Откачивание протонов создавало большой электрохимический градиент, который позволял протонам переходить обратно в клетку через АТР-зависимые протонные насосы, что приводило к обращению их действия, т.е. заставляло их функционировать как АТР-синтетазы. Поскольку таким бактериям нужно было гораздо меньше сбраживаемых питательных веществ, запасы которых всё уменьшались, эти бактерии стали быстро вытеснять своих соседей.

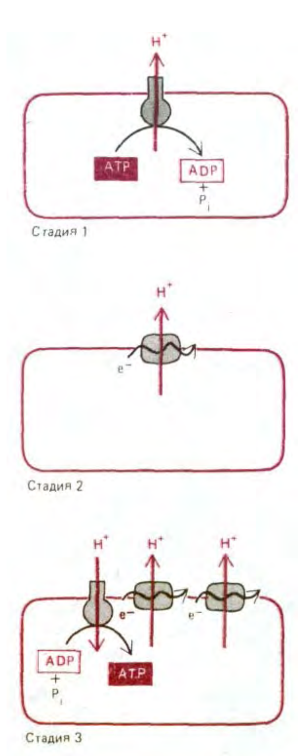


Рис. 7-58. Возможная эволюция механизмов окислительного фосфорилирования.

Эти три гипотетические стадии в эволюции механизмов окислительного фосфорилирования схематически представлены на рис. 7-58.

7.4.3. Фотосинтезирующие бактерии, найдя неисчерпаемый источник восстановительной силы, смогли преодолеть серьезный кризис в эволюции клетки

Хотя только что описанные эволюционные шаги разрешили проблему поддержания как нейтральной внутриклеточной среды, так и достаточных энергетических запасов, осталось непреодоленным другое, не менее серьезное затруднение. Истощение запасов сбраживаемых органических веществ означало, что нужно найти иной источник углерода для синтеза Сахаров - предшественников столь многих других молекул, необходимых клетке. Потенциальным источником углерода могла быть углекислота, которой было достаточно в атмосфере; однако для превращения CO_2 в органические молекулы, например углеводы, нужно восстановить связанную углекислоту сильным донором водорода (таким, как NADH или NADPH), способным отдавать богатые энергией электроны, необходимые для образования одной CH_2O-единицы из CO_2 (см. рис. 7-43). На ранних стадиях эволюции клетки большие количества таких восстанавливающих агентов образовывались при брожении. Однако по мере сокращения запасов сбраживаемых субстратов и возрастания роли мембранной АТР-синтетазы в образовании АТР запасы NADH и других восстановителей должны были тоже иссякнуть. Таким образом, клетки столкнулись с острой необходимостью найти новый источник сильных восстановителей.

Главными донорами электронов в среде, где уже не было сбраживаемых молекул, стали органические кислоты, получаемые при анаэробном метаболизме углеводов, неорганические молекулы, такие как сероводород (H_2S), образующийся в ходе геохимических процессов, и вода. Но восстанавливающая способность всех этих соединений слишком мала, чтобы ее можно было использовать для фиксации углекислоты. Впервые появление сильных доноров электронов было связано, вероятно, с использованием электрохимического протонного градиента между двумя сторонами плазматической мембраны для поддержания обратного тока электронов, что и послужило причиной возникновения мембраносвязанных ферментных комплексов, напоминающих NADH-дегидрогеназу (рис. 7-59). Однако главный эволюционный «прорыв» в энергетическом метаболизме произошел, когда возникли фотохимические реакционные центры, способные прямо синтезировать такие молекулы, как NADH. Полагают, что такие центры впервые появились больше 3 млрд. лет назад у предшественников зеленых серных бактерий. Современные зеленые серные бактерии используют лучистую энергию для переноса атома водорода (в виде электрона и протона) от молекулы сероводорода

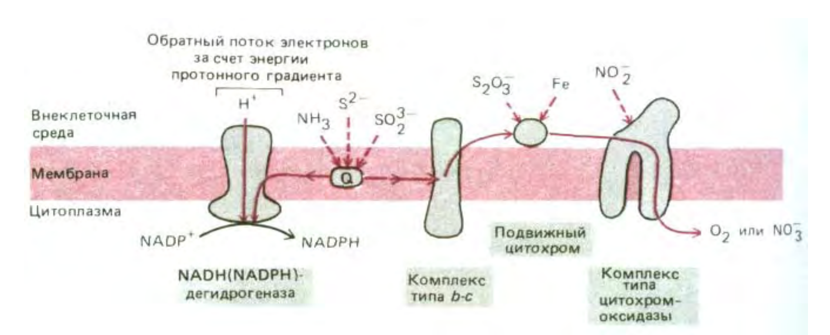


Рис. 7-59. Некоторые пути переноса электронов у современных бактерий, у которых необходимые для роста АТР и восстановительная сила образуются всецело за счет энергии окисления неорганических молекул -таких, как соединения железа, азота, серы и аммиака. Некоторые виды способны расти в анаэробных условиях благодаря замене кислорода как конечного акцептора электронов нитратом. Другие виды используют цикл фиксации углерода и синтезируют органические молекулы исключительно из CO_2. «Прямой» поток электронов позволяет откачивать из клетки протоны, и энергия возникающего при этом протонного градиента используется АТР-синтетазой для синтеза АТР (на схеме не показано). NADPH, необходимый для фиксации углерода, образуется при участии «обратного» тока электронов (см. также рис. 7-51, Б).

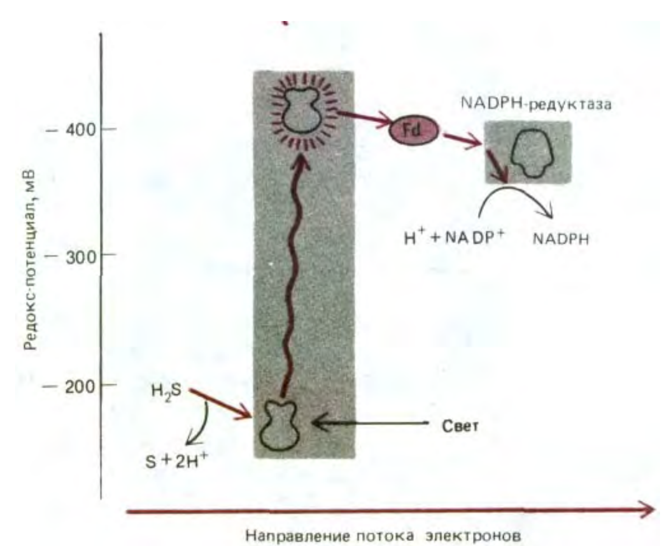


Рис. 7-60. Поток электронов в относительно примитивной схеме нециклического фотосинтеза у современных зеленых серных бактерий. Фотосистема зеленых бактерий сходна с фотосистемой I растений и цианобактерий тем, что в ней тоже используется ряд железо-серных центров, которые служат первичными акцепторами электронов и затем отдают свои высокоэнергетические электроны ферредоксину (Ф).

на $NADP^+$, создавая тем самым восстановительную силу, необходимую для фиксации углерода (рис. 7-60). Так как электроны, отнятые от H_2S, обладают гораздо более отрицательным редокс-потенциалом, чем электроны в молекуле воды (— 230 и +820 мВ соответственно), одного кванта света, поглощенного единственной имеющейся у этих бактерий фотосистемой, достаточно, чтобы достигнуть редокс-потенциала, необходимого для образования NADPH при участии сравнительно простой электронтранспортной цепи.

7.4.4. Первый атмосферный кислород был, вероятно, продуктом более сложных фотосинтетических электронтранспортных цепей цианобактерий [44]

На следующем этапе, который, как полагают, начался примерно 3 млрд. лет назад с появления цианобактерий, возникли организмы, способные использовать воду как источник водорода для восстановления CO_2. Это привело к развитию второй фотосистемы, включенной последовательно с первой, что позволило преодолеть большой разрыв в редокс-потенциалах H_2O и NADPH. Структурные гомологии между современными фотосистемами дают основание предполагать, что здесь объединились две фотосистемы, одна из которых ведет свое происхождение от зеленых бактерий (фотосистема I), а другая - от пурпурных бактерий (фотосистема II). Этот эволюционный шаг имел далеко идущие биологические последствия. Впервые появились организмы, обладавшие минимальными потребностями в химических веществах окружающей среды, и эти организмы могли распространяться и эволюционировать по путям, недоступным для более примитивных фотосинтезирующих бактерий, которые нуждались в H_2S и органических кислотах как донорах электронов. В результате накопилось большое количество восстановленного органического материала, синтезированного живыми клетками. Кроме того, впервые в атмосферу стал поступать молекулярный кислород.

Кислород весьма токсичен, так как он может инактивировать ферменты, окисляя их. Например, многие из ныне существующих анаэробных бактерий быстро погибают при контакте с воздухом. Поэтому организмы древней Земли должны были выработать средства защиты от возрастающих концентраций O_2 в окружающей среде. Существа, по-



Рис. 7-61. Связь между содержанием кислорода в атмосфере и некоторыми из важнейших гипотетических этапов эволюции жизни на Земле. Судя по геологическим данным, между возникновением цианобактерий (которые, видимо, были первыми организмами, выделявшими кислород) и началом быстрого повышения концентрации кислорода в воздухе прошло больше миллиарда лет. Такая «задержка» объясняется главным образом наличием большого запаса растворенных в океане ионов закисного (двухвалентного) железа, которые вступали в реакцию с выделявшимся кислородом, что привело к образованию огромных отложений железа в окисной форме.

явившиеся на поздних этапах эволюции, обладают многочисленными механизмами, предохраняющими их ферменты от вредного воздействия кислорода.

Вначале уровень кислорода в атмосфере повышался очень медленно. Первобытные моря содержали большие количества ионов двухвалентного железа (Fe II), и почти весь кислород, выделяемый ранними фотосинтезирующими бактериями, использовался на превращение Fe II в Fe III. что привело к осаждению огромного количества окислов железа. Обширные «полосчатые железные формации», образование которых началось примерно 2,7 млрд. лет назад, помогают определить время интенсивного развития цианобактерий. Около 2 млрд. лет назад запасы двухвалентного железа истощились и отложение железосодержащих осадков прекратилось, после чего, судя по геологическим данным, содержание кислорода в атмосфере стало повышаться и достигло современного уровня где-то в период от 0,5 до 1,5 млрд. лет назад (рис. 7-61).

Наличие кислорода сделало возможным возникновение бактерий, способных синтезировать АТР за счет аэробного метаболизма; эти бактерии могли использовать большое количество энергии, высвобождаемое при полном расщеплении углеводов и других восстановленных органических молекул до CO_2 и H_2O. В результате модификации некоторых компонентов существовавших ранее электронтранспортных комплексов образовалась цитохромоксидаза, благодаря чему электроны, извлекаемые из органических и неорганических субстратов, могли передаваться на O_2 как конечный акцептор электронов. Многие из современных пурпурных фотосинтезирующих бактерий способны переключать метаболизм с фотосинтеза на дыхание и обратно в зависимости от того, какой источник энергии более доступен - свет или кислород; такое переключение связано у них с поразительно малыми изменениями в электронтранспортной цепи.

По мере накопления органического материала в результате фотосинтеза некоторые фотосинтезирующие бактерии (в том числе предшественники *E. coli)* утратили способность существовать только за счет лучистой энергии и полностью перешли на дыхательный метаболизм. Полагают, что митохондрии впервые появились 1,5 млрд. лет назад, когда такие «дышащие» бактерии стали эндосимбионтами в примитивных эукариотических клетках (см. разд. 7.5.16). Позднее потомки ранних аэробных эукариотических клеток поглотили путем эндоцитоза какую-то фотосинтезирующую бактерию, которая и стала предшествен-

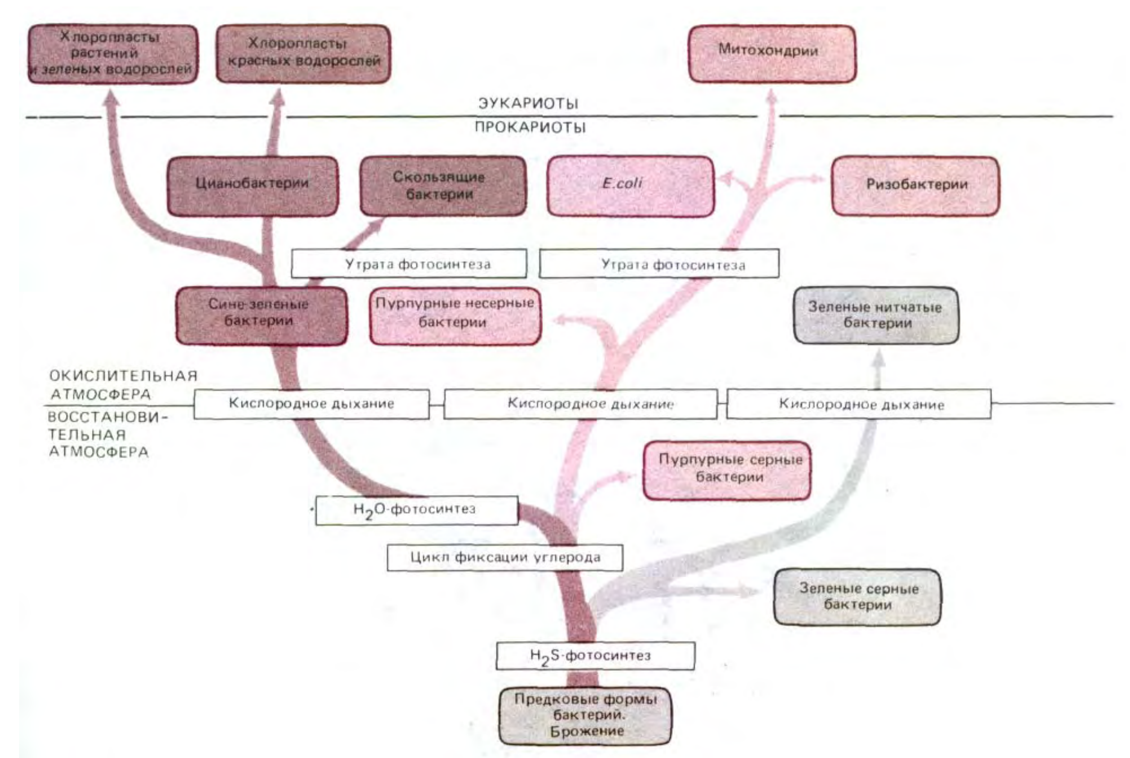


Рис. 7-62. Филогенетическое древо возможной эволюции митохондрий, хлоропластов и их бактериальных предков. Полагают, что кислородное дыхание стало развиваться примерно 2 млрд. лет назад. Как видно из рисунка, такое дыхание, вероятно, независимо возникло в трех линиях фотосинтезирующих прокариот - у зеленых, пурпурных и синезеленых бактерий. По-видимому, какая-то форма аэробных пурпурных бактерий, утратившая способность к фотосинтезу, дала начало митохондриям, тогда как несколько различных синезеленых бактерий были предками хлоропластов. Детальный анализ нуклеотидных последовательностей показывает, что митохондрии скорее всего произошли от бактерий, напоминающих современные ризобактерии, агробактерии и риккетсии - три родственные группы, представители которых вступают в тесные ассоциации с современными эукариотическими клетками (см. разд. 20.3.2 и 20.3.3).

ником хлоропластов. Однако уникальность хлоропластов у различных водорослей указывает на независимую эволюцию хлоропластов у разных групп организмов. На рис. 7-62 показаны некоторые из предполагаемых эволюционных путей, рассмотренных выше.

Эволюция всегда консервативна - все новое создается на основе какой-то части уже существующего. Например, некоторые участки электронтранспортной цепи, служившей анаэробным бактериям три миллиарда лет назад, вероятно, вошли в измененном виде в соответствующие цепи митохондрий и хлоропластов высших эукариот. Примером может служить поразительная гомология между структурой и функцией ферментных комплексов в среднем участке митохондриальной дыхательной цепи (комплекс b-c_1) и определенными участками электронтранспортной цепи бактерий и хлоропластов (рис. 7-63).

Заключение

Как полагают, древнейшие клетки представляли собой организмы, сходные с бактериями, и жили в среде, богатой восстановленными органическими молекулами, образовавшимися в ходе геохимических процессов на протяжении сотен миллионов лет. Эти организмы, вероятно, получали почти весь свой АТР путем превращения восстановленных соединений в различные органические кислоты, которые выводились, как отходы, в окружающую среду. Процессы брожения привели к закислению среды, в связи с чем, возможно, и возник первый протонный насос, связанный с мембраной, при помощи которого внутри клетки поддерживалась нейтральная реакция. Особенности современных бактерий указывают на

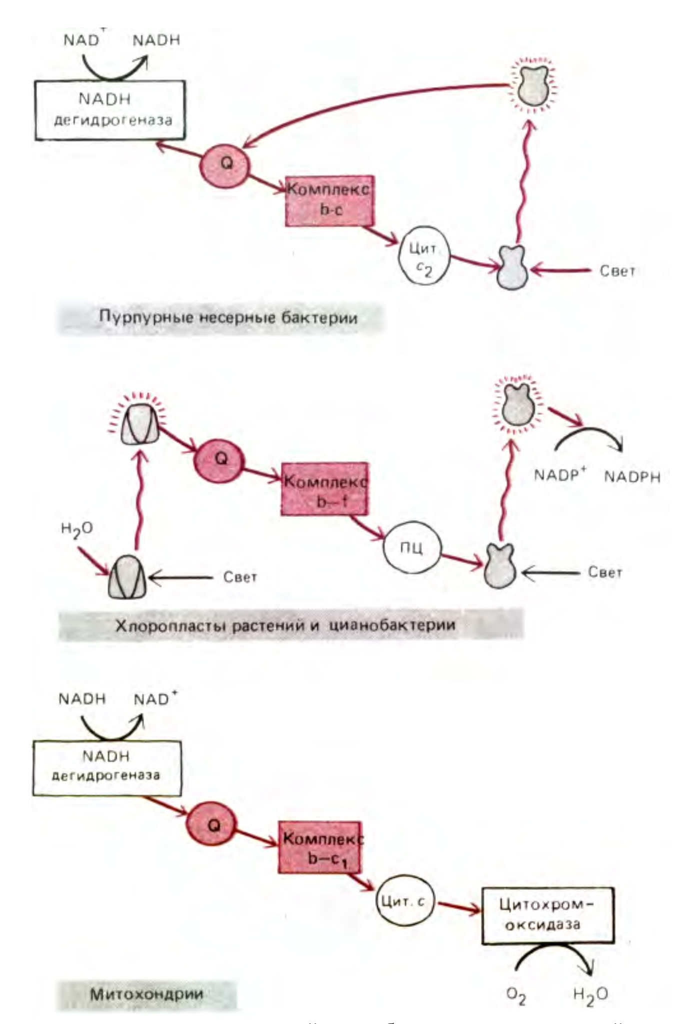


Рис. 7-63. Сравнительные схемы трех электронтранспортных цепей, подробно рассмотренных в этой главе. Бактерии и хлоропласты содержат связанный с мембраной ферментный комплекс, очень сходный с аналогичным комплексом *b-c_l* митохондрий. Все эти комплексы принимают электроны от хинона (Q) и перекачивают протоны через соответствующие мембраны. Более того, в системах, реконструированных in vitro, различные комплексы могут заменять друг друга, а анализ аминокислотных последовательностей их белковых компонентов показывает, что эти белки эволюционно родственны.

то, что протонный насос, использующий энергию переноса электронов, и протонный насос, функционирующий за счет энергии гидролиза ATP, возникли в этих анаэробных условиях. Обратимость функционирования позволила ATP-зависимому протонному насосу действовать в роли ATP-синтетазы. Поэтому по мере создания более эффективных электронтранспортных цепей энергия, высвобождаемая при окислительно-восстановительных реакциях между неорганическими молекулами, могла использоваться для синтеза ATP.

Размножение бактерий, использовавших в качестве источника углерода и восстановителей предобразованные органические молекулы, не могло продолжаться долго, так как этот источник пополнялся в результате геохимических процессов очень медленно. Истощение запасов сбраживаемых органических веществ, вероятно, привело к возникновению бактерий, способных создавать углеводы из CO_2. Используя уже имевшиеся у них части электронтранспортной цепи, фотосинтезирующие бактерии улавливали с помощью своей единственной фотосистемы лучистую энергию и направляли ее на синтез NADPH, необходимый для фиксации углерода. Последующее появление более сложной фотосинтезирующей цепи переноса электронов у цианобактерий дало возможность использовать в качестве донора электронов при образовании NADPH воду,

а не другие более редкие доноры электронов, необходимые остальным фотосинтезирующим бактериям. При этом в результате распространения жизни на обширных пространствах снова аккумулировались восстановленные органические вещества. Кислород, высвобождаемый благодаря фотосинтезу цианобактерий, стал накапливаться в атмосфере примерно 2 млрд. лет назад. При обилии кислорода и органических молекул электронтранспортные цепи адаптировались для переноса электронов с NADH на кислород и у многих бактерий выработался эффективный аэробный метаболизм. Точно такой же аэробный метаболизм характерен для митохондрий эукариотических клеток, и уже есть убедительные данные в пользу того, что митохондрии и хлоропласты - это потомки аэробных бактерий, поглощенных примитивными эукариотическими клетками путем эндоцитоза.

7.5. Геномы митохондрий и хлоропластов [45]

По мере роста и деления клеток в их цитоплазме должны образовываться новые органеллы. В неделящихся клетках тоже происходит непрерывное обновление органелл - вместо распадающихся образуются новые. Для этого требуется регулируемый синтез необходимых белков и липидов с последующей доставкой каждого компонента в надлежащий участок органеллы. В гл. 8 уже рассматривался перенос определенных белков и липидов, синтезированных вне органелл, в митохондрии и хлоропласты, а здесь речь пойдет о вкладе этих органелл в их собственный биосинтез.

В биосинтезе белков митохондрий и хлоропластов участвуют две различные генетические системы. Хотя большая часть этих белков кодируется ядерной ДНК и переходит в органеллу после того, как они были синтезированы на рибосомах цитозоля, некоторые белки кодируются собственной ДНК органеллы и синтезируются на рибосомах внутри самой органеллы. Видимо, перенос белков осуществляется только в одном направлении - из цитозоля в органеллы; во всяком случае такие белки, которые переходили бы в цитозоль из митохондрий или хлоропластов, не известны.

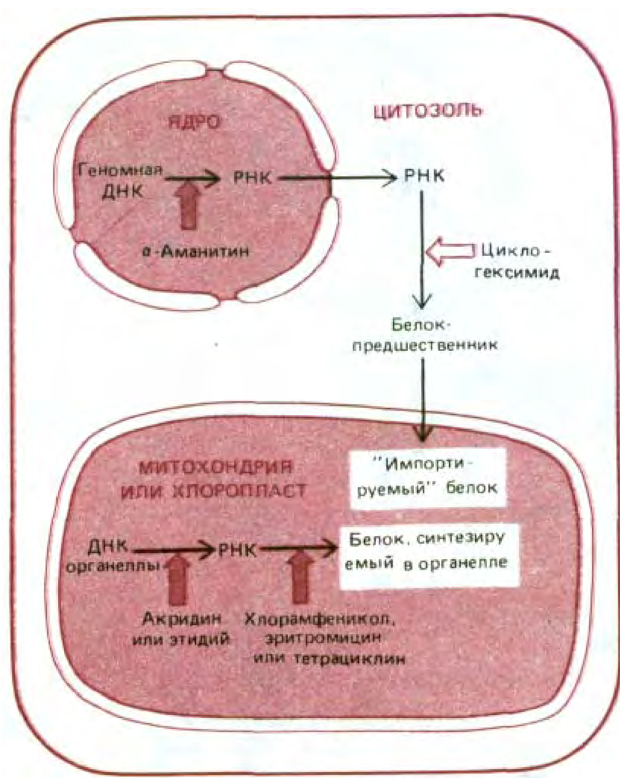


Рис. 7-64. Обобщенная схема синтеза белков, содержащихся в митохондриях и хлоропластах. Толстыми стрелками указаны места воздействия ингибиторов, специфически подавляющих белковый синтез либо в митохондриях, либо в цитозоле.

Участие двух генетических систем в образовании митохондрий и хлоропластов довольно точно согласовано (разд. 7.5.12). Однако эта согласованность не абсолютна, и изолированные органеллы продолжают некоторое время синтезировать в пробирке ДНК, РНК и белки, что позволяет установить, какие белки кодируются ДНК самой органеллы, а какие ядерной ДНК. Другой подход состоит в изучении действия специфических ингибиторов на интактную клетку. Например, *циклогексимид* ингибирует белковый синтез в цитозоле, но не влияет на синтез белка в митохондриях и хлоропластах. Некоторые другие антибиотики, такие как хлорамфеникол, тетрациклин и эритромицин, наоборот, подавляют синтез белка в энергетических органеллах, но не оказывают заметного влияния на его синтез в цитозоле (рис. 7-64). Подобные ингибиторы широко используются для изучения функций митохондрий и хлоропластов.

7-33

7.5.1. Число митохондрий и хлоропластов в клетке поддерживается путем их деления [46]

Митохондрии и хлоропласты никогда не возникают de novo, они всегда образуются путем деления уже существующих органелл. Как показывают наблюдения над живыми клетками, митохондрии не только делятся, но могут и сливаться друг с другом. Однако в среднем каждая органелла должна удвоить свою массу и затем разделиться пополам один раз за одну клеточную генерацию. Электронные микрофотографии дают основание полагать, что деление митохондрий начинается с образования кольцевой бороздки на внутренней мембране, подобно тому как это происходит при делении многих бактериальных клеток (рис. 7-65 и 7-66); таким образом, деление митохондрий - это, по-видимому, контролируемый процесс, а не случайное расщепление надвое.

В большинстве клеток энергопреобразующие органеллы делятся на протяжении всей интерфазы; таким образом, каждая из них делится независимо от остальных и от всей клетки. Точно так же репликация ДНК в органеллах происходит не только в период синтеза ядерной ДНК (S-фаза), но и в другие фазы клеточного цикла. Хотя, по-видимому, индивидуальные молекулы ДНК реплицируются случайным образом (так что в данном клеточном цикле одни могут удвоиться несколько раз, а другие ни разу), общее число их за каждый клеточный цикл удваивается, поддерживая постоянство количества этой ДНК в клетке.

Число энергетических органелл может регулироваться в зависимости от потребности клетки в энергии; например, значительное увеличение (в 5-10 раз) количества митохондрий наблюдается при многократном сокращении скелетной мышцы в течение длительного периода. Более того, в ряде случаев деление органелл регулируется клеткой: так, хлоропласты некоторых водорослей, содержащих только одну или несколько таких органелл, делятся непосредственно перед цитокинезом, причем в той же плоскости, в которой будет происходить очередное деление клетки (рис. 7-67). Но действующие при этом регуляторные механизмы на молекулярном уровне не изучены.

7.5.2. В большинстве случаев геномы хлоропластов и митохондрий представлены кольцевыми молекулами ДНК [47]

Молекулы ДНК органелл относительно просты, невелики и (за исключением митохондриальных геномов некоторых водорослей и простейших) замкнуты в кольцо. Размеры генома хлоропластов у всех исследованных организмов сходны, тогда как митохондриальные геномы

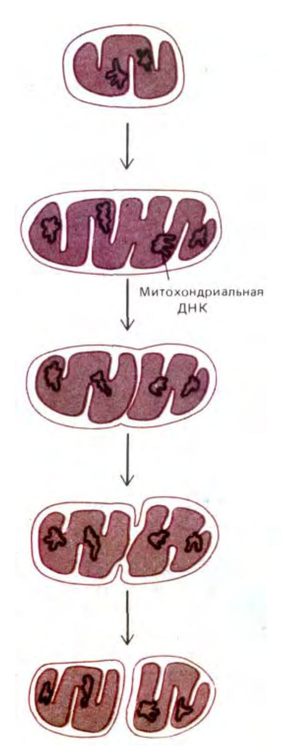


Рис. 7-65. Схема деления митохондрии. Представленный здесь ход событий предполагают, основываясь на статичных изображениях, таких как микрофотография, приведенная на рис. 7-66.



Рис. 7-66. Электронная микрофотография делящейся митохондрии из клетки печени. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

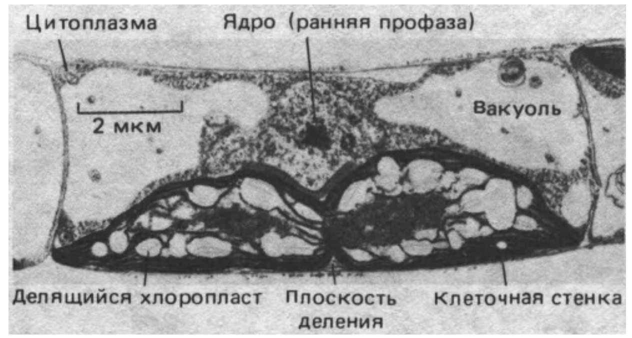


Рис. 7-67. У примитивной нитчатой водоросли *Klebsormidium* деление хлоропласта происходит в определенное время на ранней стадии митоза. В клетке имеется только один хлоропласт, и плоскость его деления совпадает с плоскостью последующего разделения клетки. (Из J. D. Pickett-Heaps, Cytobios, 1972, 6, 167-183.)

у растений намного больше, чем у животных (табл. 7-2). У многих органелл молекулы ДНК по размерам близки к вирусным ДНК. Например, в митохондриях млекопитающих геном представлен кольцевой ДНК, содержащей около 16500 пар оснований (более чем в 10000 раз меньше ядерного генома). У столь различных животных, как дрозофила и морской еж, размеры митохондриальной ДНК почти одинаковы (рис. 7-68). У растений, однако, кольцевой геном митохондрий в 100-150 раз больше в зависимости от вида растения. Размеры самой большой из этих молекул ДНК примерно вдвое меньше, чем у бактериальной ДНК, которая тоже замкнута в кольцо.

Все митохондрии и хлоропласты содержат по нескольку копий своей геномной ДНК (табл. 7-3). Эти молекулы ДНК обычно распределены в виде отдельных групп в матриксе митохондрий и в строме хлоропластов, где, как полагают, они прикреплены к внутренней мембране. Хотя способ упаковки ДНК неизвестен, геном по своей структуре, вероятно, сходен не с хроматином эукариот, а с бактериальным геномом. Например, как и у бактерий, здесь нет гистонов.

В клетках млекопитающих митохондриальная ДНК составляет меньше 1% всей клеточной ДНК. Однако в других клетках (например, в листьях высших растений или в очень крупных яйцах амфибий) доля

Таблица 7-2. Размеры геномов органелл[1)]

Тип ДНК	Размеры в тысячах пар нуклеотидов
ДНК хлоропластов	
Высшие растения	120-200
Chlamydomonas (зеленая водоросль)	180
Митохондриальная ДНК	
Животные (включая плоских червей, насекомых и млекопитающих)	16-19
Высшие растения	150-2500
Грибы	
Schizosaccharomyces pombe (дрожжи)	17
Aspergillus nidulans	32
Neurospora crassa	60
Saccharomyces cerevisiae (дрожжи)	78
Chlamydomonas (зеленая водоросль)	16 (линейная молекула)
Простейшие	
Trypanosoma brucei	22
Paramecium	40 (линейная молекула)

[1)] Эти геномы представлены кольцевыми молекулами ДНК, если не указано иное.

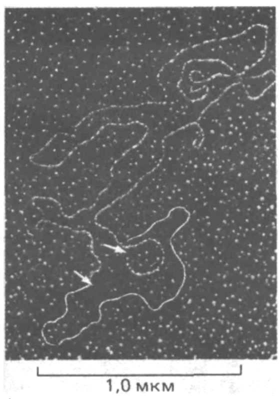


Рис. 7-68. Электронная микрофотография кольцевой ДНК из митохондрии млекопитающего во время репликации. Пока реплицировался только участок между двумя точками, указанными стрелками (цепи, выделенные белым цветом). (С любезного разрешения David Clayton.)

Таблица 7-3. Относительное количество ДНК органелл в некоторых клетках и тканях

Организмы	Ткань или тип клеток	Число молекул ДНК на 1 органеллу	Число органелл в клетке	Доля ДНК органелл во всей ДНК клетки, %
Митохондриальная ДНК				
Крыса	Печень	5-10	1000	1
Мышь	Клетки линии L	5-10	100	<1
Дрожжи *	Вегетативные клетки	2-50	1-50	15
Лягушка	Яйцеклетка	5-10	10^7	99
ДНК хлоропластов				
Chlamydomonas	Вегетативные клетки	80	1	7
Кукуруза	Листья	20-40	20-40	15

ДНК энергетических органелл может быть намного больше (табл. 7-3); в них осуществляется также и большая доля всего клеточного синтеза РНК и белков.

7.5.3. Митохондрии и хлоропласты обладают полноценной генетической системой [48]

Несмотря на небольшое число белков, кодируемых генами митохондрий и хлоропластов, эти органеллы осуществляют репликацию и транскрипцию своей ДНК и белковый синтез. Эти процессы протекают в матриксе митохондрий и строме хлоропластов. Хотя белки, участвующие во всех этих процессах, специфичны для органелл, большая часть их кодируется ядерным геномом (разд. 7.5.17). Это тем более удивительно в связи с тем, что весь аппарат белкового синтеза в органеллах сходен с бактериальным, а не с эукариотическим. У хлоропластов это сходство особенно велико:

1. Рибосомы хлоропластов очень напоминают рибосомы *E. coli* как по своей чувствительности к различным антибиотикам (хлорамфениколу, стрептомицину, эритромицину, тетрациклину и др.), так и по структуре. При этом не только поразительно сходны нуклеотидные последовательности рибосомных РНК хлоропластов и *E. coli,* но рибосомы хлоропластов способны использовать тРНК бактерий при синтезе белка. Во всех этих отношениях рибосомы хлоропластов отличаются от рибосом, находящихся в цитозоле растительных клеток.

2. Синтез белка в хлоропластах начинается с N-формилметионина, как и у бактерий, а не с метионина, как в цитозоле эукариотических клеток.

3. ДНК хлоропластов в отличие от ядерной ДНК может транскрибироваться с помощью РНК-полимеразы из *E. coli* с образованием хлоропластных мРНК, которые эффективно транслируются белок-синтезирующей системой *E. coli.*

Хотя у митохондрий генетические системы гораздо менее сходны с аналогичными системами современных бактерий, чем у хлоропластов,

митохондриальные рибосомы тоже чувствительны к противобактериальным антибиотикам, а белковый синтез в митохондриях начинается с N-формилметионина.

7.5.4. Геном хлоропластов высших растений содержит около 120 генов [49]

Гены хлоропластов наиболее изучены у растений и зеленых водорослей, у которых эти органеллы очень сходны. Геном хлоропласта представляет собой кольцевую молекулу ДНК; в настоящее время определена его полная нуклеотидная последовательность у табака и одного печеночника. Полученные данные говорят о том, что гены хлоропластов этих очень отдаленно родственных высших растений практически идентичны. Помимо четырех рибосомных РНК эти геномы кодируют около 20 рибосомных белков, некоторые субъединицы хлоропластной РНК-полимеразы, несколько белков, входящих в состав фотосистем I и II, субъединицы АТР-синтетазы, части ферментных комплексов электрон-транспортной цепи, одну из двух субъединиц рибулозобисфосфат-карбоксилазы и 30 тРНК (рис. 7-69). Кроме того, последовательность ДНК, по-видимому, кодирует еще по меньшей мере 40 белков с невыясненной функцией. Удивительно, что все известные белки, кодируемые в хлоропластах, входят в состав больших ферментных комплексов, которые содержат также одну или несколько субъединиц, кодируемых ядерным геномом. Возможные причины этого будут рассмотрены позже (разд. 7.5.17).

Поражает сходство хлоропластного и бактериального геномов. Основные регуляторные последовательности, такие как промоторы и терминаторы транскрипции, в обоих геномах фактически идентичны. Белки, кодируемые в хлоропластах, очень похожи на бактериальные, а некоторые группы генов с близкими функциями (например, кодирующие белки рибосом) организованы одинаково в геномах хлоропластов, *E. coli* и цианобактерий.

Для того чтобы проследить цепь эволюции от бактерий до хлоро-

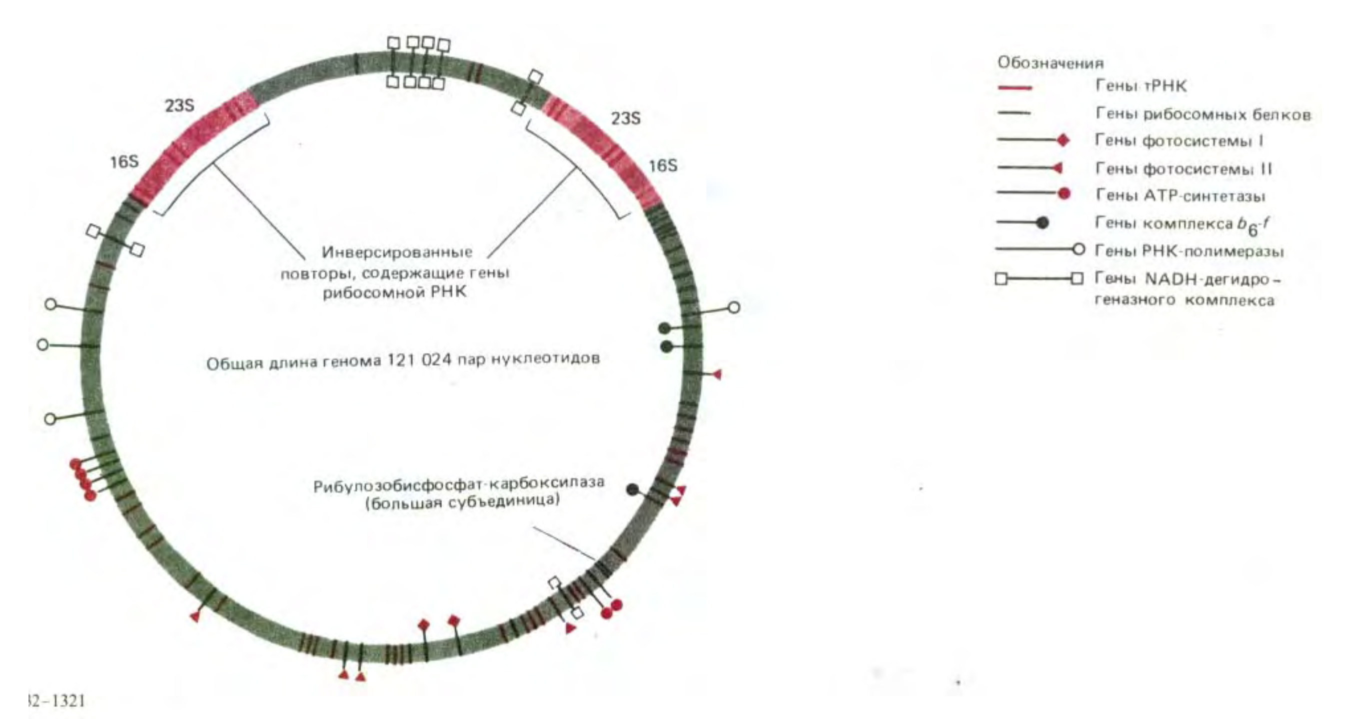


Рис. 7-69. Организация генома хлоропласта у печеночника. Для этого генома определена полная нуклеотидная последовательность. У всех высших растений организация хлоропластных геномов очень сходна, размеры кольцевой молекулы ДНК варьируют от вида к виду в зависимости от того, какая часть ДНК вокруг генов, кодирующих рибосомные РНК 16S и 23S, представлена двумя копиями.

пластов, потребуются детальные сравнения гомологичных нуклеотидных последовательностей, но некоторые выводы можно сделать уже сейчас:

1) хлоропласты высших растений произошли от фотосинтезирующих бактерий;

2) геном хлоропластов остается почти неизменным уже по меньшей мере несколько сот миллионов лет (именно столько лет назад, по-видимому, разошлись пути эволюции печеночников и табака);

3) многие из генов исходной бактерии можно сейчас идентифицировать в ядерном геноме, в который они были перенесены и сохранились до настоящего времени. Например, хотя у высших растений белки рибосом в хлоропластах родственны бактериальным белкам и сами эти рибосомы сходны с рибосомами бактерий, две трети из примерно 60 белков хлоропластных рибосом кодируются в ядре клетки.

7-34

7.5.5. Геном митохондрий имеет ряд поразительных особенностей [50]

Геном хлоропластов не был первым полностью расшифрованным геномом органелл. Первым оказался митохондриальный геном человека: относительно малые размеры сделали его особенно привлекательным объектом для молекулярных генетиков, вооруженных новейшей методикой секвенирования ДНК (см. разд. 4.6.6), и в 1981 г. была опубликована полная последовательность этого генома, состоящая из 16569 пар нуклеотидов. Сопоставляя ее с известными нуклеотидными последовательностями тРНК и частичными аминокислотными последовательностями белков, кодируемых генами митохондрий, удалось определить на кольцевой молекуле ДНК локализацию всех этих генов (рис. 7-70). По сравнению с геномами ядра, хлоропластов и бактерий митохондриальный геном человека имеет несколько поразительных особенностей:

1) здесь в отличие от других геномов практически каждый нуклеотид входит в состав кодирующей последовательности либо для белка, либо для одной из рРНК или тРНК. Поскольку эти кодирующие последовательности переходят непосредственно одна в другую, для регуляторных последовательностей ДНК остается очень мало места;

2) если в цитозоле имеется по меньшей мере 31 тРНК для различных аминокислот, а в хлоропластах - 30 тРНК, то в митохондриях для осуществления белкового синтеза используются всего 22 тРНК. В митохондриях обычные правила спаривания кодонов с антикодонами со-

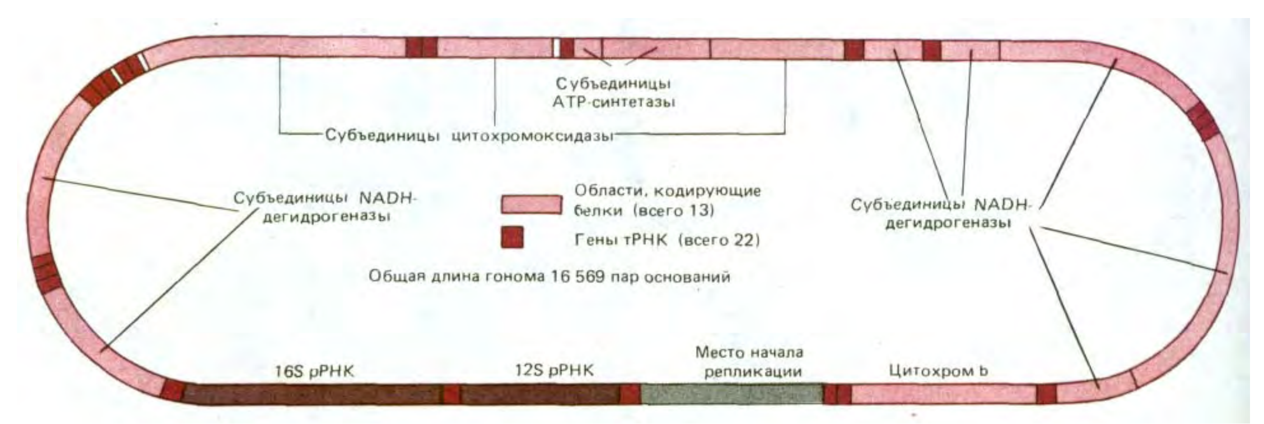


Рис. 7-70. Организация митохондриального генома человека, установленная в результате определения полной нуклеотидной последовательности ДНК. Геном содержит два гена рРНК, 22 гена тРНК и 13 участков, кодирующих белки. Определены также полные последовательности молекул ДНК митохондриальных геномов коровы и мыши, которые содержат те же гены и организованы сходным образом.

Таблица 7-4. Различия между «универсальным» кодом и митохондриальными генетическими кодами*

Кодон	**«Универсальный» код**	***Митохондриальные коды***			
		Млекопитающие	**Дрозофила**	**Дрожжи**	**Растения**
UGA	STOP	*Trp*	Trp	Trp	STOP
AUA	Ile	*Met*	*Met*	*Met*	Ile
CUA	*Leu*	Leu	Leu	*Thr*	Leu
AGA, *AGG*	Arg	*STOP*	*Ser*	Arg	Arg

* *Курсивом и цветом выделены значения кодонов, отличающиеся от «универсального» кода.*

блюдаются менее строго, и многие молекулы тРНК способны узнавать любой из четырех нуклеотидов в третьей (неоднозначной) позиции (разд. 5.1.6). Такое считывание «двух из трех» дает возможность одной тРНК связываться с любым из четырех различных кодонов и позволяет обходиться меньшим числом тРНК при синтезе белка;

3) сопоставление нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов с аминокислотными последовательностями белков выявило, возможно, самую поразительную особенность: генетический код в митохондриях видоизменен, и значения четырех из 64 кодонов отличны от значений этих кодонов в других геномах (табл. 7-4).

Почти полная идентичность генетического кода у всех организмов служит убедительным доводом в пользу того, что все клетки произошли от общего предшественника. Как же в этом случае объяснить некоторые отличия генетического кода митохондрий? Приблизиться к пониманию этого помогли недавно полученные данные о различии генетического кода в митохондриях разных организмов. Например, триплет UGA, служащий в универсальном коде стоп-кодоном, в митохондриях млекопитающих, грибов и простейших кодирует триптофан, но в митохондриях растений используется как стоп-кодон. Аналогичным образом триплет AGG, обычно кодирующий аргинин, в митохондриях млекопитающих обозначает сигнал "stop", а у дрозофилы кодирует серин (табл. 7-4). Подобные отклонения указывают на то, что в генетическом коде митохондрий могут происходить случайные перемены. Вероятно, возможность появления и закрепления в потомстве случайных изменений в значении кодона связана с необычайно малым числом белков, кодируемых митохондриальным геномом; в большом геноме подобные изменения привели бы к нарушению функции многих белков и, как следствие, к гибели клетки.

7.5.6. Митохондрии животных имеют самую простую из известных генетических систем [52]

Сравнение последовательностей ДНК у разных организмов показывает, что в митохондриальном геноме скорость замены нуклеотидов в процессе эволюции в 10 раз выше, чем в ядре, что, вероятно, объясняется снижением точности либо репликации, либо репарации митохондриальной ДНК, либо того и другого вместе. Поскольку в митохондриях животной клетки все РНК и белки образуются в результате репликации и экспрессии последовательности ДНК, состоящей всего лишь из 16500 нуклеотидов, вероятность ошибки на каждый считываемый нуклеотид

в ходе репликации и репарации ДНК, транскрипции с помощью РНК-полимеразы и трансляции при синтезе белка на митохондриальной рибосоме может быть относительно высокой без вреда для органеллы. По-видимому, этим и объясняется, почему механизмы таких процессов относительно просты по сравнению с теми, которые используются клеткой для тех же целей вне органелл. Например, можно предположить (хотя это еще достоверно не установлено), что наличие всего только 22 тРНК и необычно малые размеры рРНК (менее 2/3 от их величины у *E. coli)* снижают точность белкового синтеза в митохондриях.

Благодаря относительно быстрой эволюции митохондриальных генов сравнение последовательностей в их ДНК может быть особенно полезным для датирования таких недавних событий, как этапы эволюции приматов (см. разд. 1.2.2).

7-35

7.5.7. Почему у растений такой большой митохондриальный геном? [52]

У растений геном митохондрий значительно больше, чем в животных клетках, и содержание митохондриальной ДНК варьирует в широких пределах - примерно от 150000 до 2,5 млн. пар нуклеотидов. И тем не менее митохондриальный геном у растений, видимо, кодирует немногим больше белков, чем у животных. К этому можно еще добавить, что, например, внутри одного из семейств растений (тыквенных) размеры митохондриального генома различаются в семь раз; а линейный митохондриальный геном зеленой водоросли *Chlamydomonas* имеет такие же размеры, как и в животных клетках, и составляет 16000 пар нуклеотидов.

О последовательностях нуклеотидов в митохондриальной ДНК высших растений сведений очень мало, но секвенирован почти полностью большой (78 000 п. н.) митохондриальный геном дрожжей *Saccharomyces cerevisiae,* и оказалось, что только около трети его кодирует белки. Эти данные говорят о том, что, возможно, большая часть «избыточной» ДНК в митохондриях дрожжей (а может быть, и высших растений) не имеет существенного значения для организма.

7.5.8. Некоторые гены органелл содержат интроны [53]

В обеих детально изученных митохондриальных системах - человеческой и дрожжевой - важную роль играет процессинг РНК-предшественников. В клетках человека обе цепи митохондриальной ДНК транскрибируются с одинаковой скоростью от единственного промотора на каждой цепи, и при этом образуются две различные гигантские молекулы РНК, каждая из которых представляет собой полную копию одной цепи ДНК. Таким образом, транскрипция совершенно симметрична. Молекула РНК, транскрибированная с одной из цепей ДНК, которую называют *тяжелой цепью* (Н-цепью) из-за ее высокой плотности, выявляемой в градиенте CsCl, расщепляется нуклеазами, и в результате получаются две молекулы рРНК, большая часть митохондриальных тРНК и около десятка РНК, содержащих концевой поли(А). В отличие от этого процессинг РНК, транскрибированной с *легкой цепи* (L-цепи), приводит к образованию только восьми тРНК и одной малой РНК, содержащей поли(А). Остальные 90% нуклеотидов этого транскрипта, видимо, не несут полезной информации (будучи комплементарными кодирующей последовательности, синтезированной на другой цепи) и расщепляются. Как полагают, РНК, содержащие концевой поли(А), представляют

собой митохондриальные мРНК; у них отсутствует «кэп» на 5'-конце, а 3'-концевой участок поли(А) содержит около 55 нуклеотидов. Этот полинуклеотидный хвост добавляется после транскрипции при участии митохондриальной поли-А-полимеразы.

В отличие от человека у некоторых растений и грибов (включая дрожжи) митохондриальные гены содержат *интроны,* которые должны быть удалены из транскрипта с последующим сплайсингом (разд. 3.2.7). У растений интроны обнаружены также примерно в 20 генах хлоропластов. Многие интроны в генах органелл содержат родственные нуклеотидные последовательности, которые могут исключаться из РНК-транскриптов в результате реакции, катализируемой самой РНК (разд. 9.4.14), хотя в этом «самосплайсинге» обычно участвуют и белки. Открытие интронов в генах органелл было неожиданным с точки зрения эндосимбиотической теории происхождения энергопреобразующих органелл, так как в генах бактерий, от предков которых могли произойти митохондрии и хлоропласты, интронов не обнаружено.

У дрожжей интроны могут иметься в митохондриальном гене одного штамма, но отсутствовать в том же гене другого штамма. По-видимому, такие «факультативные» интроны способны включаться в гены и выходить из них подобно транспозонам. С другой стороны, в некоторых митохондриальных генах дрожжей интроны занимают те же позиции, что и в митохондриях *Aspergillus* и *Neurospora;* значит, они были унаследованы от общего предка этих трех грибов. Вероятно, интроны имеют древнее происхождение, и хотя они были утрачены многими бактериями, они сохранились в геномах тех органелл, где регуляция сплайсинга РНК помогает контролировать экспрессию гена (разд. 10.5.5).

7-36

7.5.9. Неменделевское (цитоплазматическое) наследование митохондриальных генов позволяет отличать их от генов клеточного ядра [54]

По ряду причин большинство экспериментов по изучению механизмов биогенеза митохондрий проводится на культурах *Saccharomyces carlsbergensis* (пивные дрожжи) и *S. cerevisiae* (пекарские дрожжи). Во-первых, при росте на глюкозе эти дрожжи обнаруживают уникальную способность существовать только за счет гликолиза и поэтому могут обходиться без функционально активных митохондрий, т.е. без окислительного фосфорилирования. Это дает возможность работать с клетками, митохондриальная и ядерная ДНК которых несут мутации, препятствующие нормальному развитию митохондрий. Такие мутации летальны почти у всех организмов. Во-вторых, дрожжи - простые одноклеточные эукариоты - легко выращивать и подвергать биохимическим исследованиям. И наконец, у дрожжей, обычно размножающихся бесполым способом путем почкования (асимметричного митоза), встречается и половой процесс. При половом размножении две гаплоидные клетки сливаются, образуя диплоидную зиготу, которая затем либо делится путем митоза, либо претерпевает мейоз и снова дает гаплоидные клетки. Возможность контролировать в лабораторных условиях чередование бесполого и полового размножения (разд. 13.2) намного облегчает проведение генетического анализа. Такой анализ позволяет выявить гены, ответственные за функцию митохондрий, и установить, которые из них находятся в ядерной ДНК и которые - в митохондриальной, поскольку мутации митохондриальных генов не наследуются по законам Менделя, которым подчиняется наследование ядерных генов.

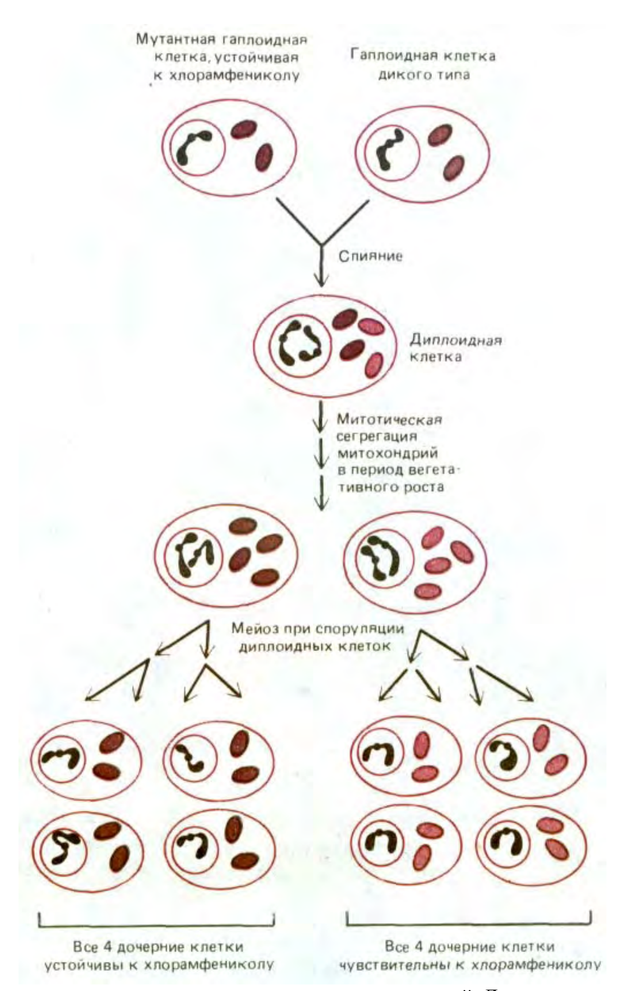


Рис. 7-71. Различие в схеме наследования митохондриальных и ядерных генов у дрожжей. Две дрожжевые клетки из четырех, образовавшихся в результате мейоза, получают тот или иной ядерный ген от одной гаплоидной родительской клетки, а две другие - от другой *(менделевское наследование).* В отличие от этого в результате постепенной митотической сегрегации митохондрий в период вегетативного роста (см. текст) вполне может случиться, что все четыре клетки, образовавшиеся при мейозе, получат митохондриальные гены только от одной из двух гаплоидных родительских клеток *(неменделевское,* или *цитоплазматическое, наследование).* В этом примере мутация митохондриального гена придает митохондриям устойчивость к хлорамфениколу - ингибитору белкового синтеза в энергопреобразующих органеллах и бактериях (разд. 5.1.15).

На рис. 7-71 приведен пример **неменделевского (цитоплазматического) наследования** митохондриальных генов в потомстве гаплоидных дрожжевых клеток. Мутантный ген придает белок-синтезирующей системе митохондрий устойчивость к хлорамфениколу; дрожжевые клетки, несущие такой ген, можно легко обнаружить, выращивая культуры в присутствии хлорамфеникола на таком субстрате, как глицерол, который нельзя использовать для гликолиза. В условиях блокады гликолиза ATP будет доставляться только функционально активными митохондриями, и поэтому на такой среде способны расти лишь клетки, обладающие устойчивыми к хлорамфениколу митохондриями. При слиянии гаплоидной клетки, устойчивой к хлорамфениколу, с гаплоидной клеткой дикого типа, чувствительной к этому антибиотику, образуется диплоидная зигота, содержащая смесь митохондрий как мутантного, так и дикого типа. Но если в результате митоза от зиготы отпочкуется диплоидная дочерняя клетка, то в нее перейдет лишь небольшая часть митохондрий. После нескольких митотических циклов в какой-то из новых клеток все митохондрии могут оказаться одинаковыми - либо мутантного, либо дикого типа. Поэтому все потомство такой клетки будет иметь генетически идентичные митохондрии. Такой случайный процесс, в результате

которого образуется диплоидное потомство с митохондриальной ДНК только одного типа, называют *митотической сегрегацией.* Когда диплоидная клетка с одним типом митохондрий претерпевает мейоз, все четыре дочерние гаплоидные клетки получают одинаковые митохондриальные гены. Этот тип наследования называют *неменделевским,* или *цитоплазматтеским,* в отличие от менделевского наследования ядерных генов (рис. 7-71); он указывает на то, что изучаемый ген находится вне ядерных хромосом, т.е., вероятно, в органеллах цитоплазмы.

7.5.10. У многих организмов гены органелл наследуются по материнской линии [55]

Для некоторых организмов, в том числе и для человека, последствия цитоплазматической передачи генов более существенны, чем для дрожжей. У дрожжей сливающиеся две гаплоидные клетки имеют одинаковые размеры и вносят в зиготу одинаковое количество митохондриальной ДНК (рис. 7-71). Таким образом, у дрожжей митохондриальный геном наследуется от *обоих* родителей, вносящих равный вклад в генофонд потомства (хотя, как мы видели, спустя несколько генераций *отдельные* потомки нередко будут содержать митохондрии только одного из родительских типов). В отличие от этого у высших животных яйцеклетка вносит в зиготу намного больше цитоплазмы, чем спермий, а у некоторых животных спермин могут вообще не вносить цитоплазмы. Поэтому можно думать, что у высших животных митохондриальный геном будет передаваться только от *одного* родителя, а именно *по материнской линии.* Это было подтверждено в экспериментах с лабораторными животными двух линий, различающихся по типу митохондриальной ДНК. При скрещивании животных, несущих митохондриальную ДНК типа А, с животными типа В получается потомство, содержащее митохондриальную ДНК только материнского типа. Точно так же, если проследить распределение различных последовательностей митохондриальной ДНК в больших семьях, можно показать, что ДНК митохондрий и у человека наследуется по материнской линии.

Примерно у двух третей высших растений хлоропласты мужского родителя (они содержатся в пыльцевых зернах) не попадают в зиготу; таким образом, ДНК хлоропластов, так же как и митохондрий, наследуется по материнской линии. У других растений дефектные хлоропласты служат причиной *пестролистности:* в результате митотической сегрегации в процессе роста и развития растения смесь нормальных и дефектных хлоропластов разделяется, что приводит к образованию листьев с чередующимися зелеными и белыми участками; в зеленых участках содержатся нормальные хлоропласты, а в белых - дефектные.

7.5.11. Как показывает изучение мутантов "petite" у дрожжей, важнейшую роль в биогенезе митохондрий играет клеточное ядро

Ключевую роль в анализе биогенеза митохондрий сыграли генетические исследования на дрожжах. Ярким примером служит изучение мутантов с обширными делециями в митохондриальной ДНК, которая приводит к полному прекращению белкового синтеза в митохондриях. Не удивительно поэтому, что у таких мутантов отсутствуют «дышащие» митохондрии. Редко встречающаяся, но важная группа таких мутантов вообще не имеет митохондриальной ДНК. Так как при росте на среде с низким содержанием глюкозы такие мутанты образуют необычно мелкие колонии, всех мутантов с дефектными митохондриями называют *цитоплазматическими мутантами petite.*

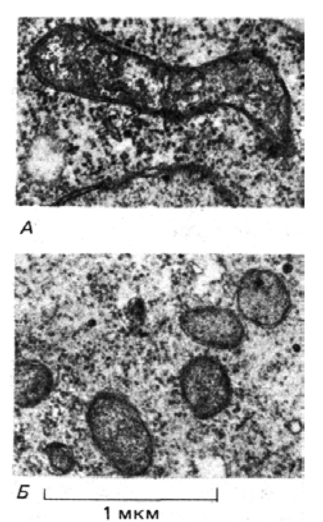


Рис. 7-72. Электронные микрофотографии тонких срезов дрожжевых клеток; можно видеть строение нормальных митохондрий *(А)* и строение митохондрий у мутанта petite, у которого отсутствуют все белки, кодируемые митохондриальным геномом *(Б).* В последнем случае органелла состоит только из белков, кодируемых ядерным геномом. (С любезного разрешения Barbara Stevens.)

Хотя у мутантов petite нет митохондриального синтеза белка и поэтому они не образуют митохондрий, способных синтезировать АТР, тем не менее у них есть митохондрии с нормальной наружной мембраной, но с плохо развитыми кристами внутренней мембраны (рис. 7-72). В таких митохондриях имеются практически все митохондриальные белки, кодируемые ядерным геномом и переносимые в органеллу из цитозоля, в том числе ДНК- и РНК-полимеразы, все ферменты цикла лимонной кислоты и большинство белков внутренней мембраны. Это наглядно демонстрирует преобладающую роль ядерного генома в биогенезе митохондрий. Кроме того, ясно, что органеллы, способные делиться надвое, могут неопределенно долго воспроизводиться в цитоплазме пролиферирующих эукариотических клеток даже при полном отсутствии собственного генома. Многие биологи полагают, что таким же путем обычно воспроизводятся пероксисомы (разд. 8.5.2).

Что касается хлоропластов, то здесь ближайшими аналогами дрожжевых митохондриальных мутантов petite могут служить мутанты таких одноклеточных водорослей, как *Euglena.* Клетки, в которых отсутствует хлоропластный синтез белка, все же содержат хлоропласты и вполне жизнеспособны при наличии окисляемых субстратов. Однако если у высших растений развитие зрелых хлоропластов блокировано из-за отсутствия света (разд. 20.4.1), из-за дефектов их ДНК или ее полного отсутствия, то такие растения погибают, как только запасы питательных веществ истощаются.

7-37

7.5.12. Образование митохондрий и хлоропластов регулируется белками, кодируемыми ядерным геномом [57]

Генетические системы ядра и органелл должны координировать свое участие в построении митохондрий и хлоропластов. Общий контроль, несомненно, осуществляется ядром, поскольку у мутантов с блокированным синтезом белка в органеллах митохондрии и хлоропласты образуются в нормальных количествах, хотя и с нарушенной функцией. В некоторых из таких функционально дефектных органелл продолжается синтез ДНК и частично РНК, из чего следует, что все необходимые для этих процессов белки кодируются ядерными генами.

Ядро должно регулировать число митохондрий и хлоропластов в соответствии с потребностью клетки; ядро должно также контролировать количество белков, синтезируемых на рибосомах внутри органелл, чтобы поддерживать надлежащий баланс между участием ядра и органелл в биогенезе митохондрий и хлоропластов. Хотя эти регуляторные аспекты имеют ключевое значение для понимания гомеостаза эукариотических клеток, наши знания об этом недостаточны.

Ядерную регуляцию белкового синтеза в митохондриях интенсивно изучали на дрожжевых мутантах. У *Saccharomyces cerevisiae* было выделено множество мутантов с изменениями в ядерном (а также и в митохондриальном - см. разд. 7.5.9) геноме, не способных к образованию дышащих митохондрий. Каждый из этих *ядерных мутантов petite* имеет один дефектный белок, кодируемый ядерной ДНК и необходимый для функционирования митохондрий. Выращивая дрожжевые культуры на среде с мечеными аминокислотами и циклогексимидом, подавляющим синтез белков, кодируемых ядерными генами, можно установить, какое влияние оказывает каждая из таких ядерных мутаций на экспрессию митохондриальных генов. Оказалось, что мутации ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, непосредственно связанные с дыхательной функцией митохондрий (такие, как одна из субседениц АТР-

синтетазы или один из ферментов цикла лимонной кислоты), как и следовало ожидать, не влияют на белковый синтез в митохондриях. Мутации же тех генов ядра, в которых закодированы белки митохондриальных рибосом или субъединицы митохондриальной РНК-полимеразы, блокируют в митохондриях синтез всех белков.

К регуляторным процессам наибольшее отношение имеет третья группа ядерных мутантов petite, у которых отсутствуют или изменены один или несколько генных продуктов, кодируемых митохондриальной ДНК. В ядре дрожжевой клетки обнаружено более 50 таких генов, и некоторые из них, необходимые для экспрессии того или иного митохондриального гена, уже подвергнуты клонированию и охарактеризованы. Часть этих генов кодирует белки, которые, видимо, воздействуют прямо на определенную молекулу мРНК, повышая либо ее стабильность, либо эффективность ее использования в митохондриальном белковом синтезе. Продукты других генов участвуют в сплайсинге митохондриальной РНК и, следовательно, необходимы для экспрессии тех генов митохондрий, которые содержат интроны. Как полагают, оба типа ядерных генов участвуют в регуляции функций белков, кодируемых митохондрией, в соответствии с метаболическими потребностями клетки, однако механизмы этой регуляции не известны.

Хотя главная роль и принадлежит ядру, есть данные о том, что взаимодействие генетических систем ядра и митохондрий происходит в обоих направлениях. Например, если в интактной клетке блокировать митохондриальный синтез белка, то будет наблюдаться повышенное образование переносимых в органеллу ферментов, участвующих в синтезе митохондриальных ДНК, РНК и белков, как будто клетка пытается преодолеть эту блокаду. Природу сигнала, посылаемого от митохондрий к ядру, еще предстоит выяснить.

7.5.13. Энергопреобразующие органеллы содержат тканеспецифические белки [58]

Клетка регулирует функции митохондрий и более обычными способами. У млекопитающих главным метаболическим путем переработки азотсодержащих продуктов обмена служит *цикл мочевины.* Образующаяся при этом мочевина выводится с мочой. Ферменты, кодируемые ядерным геномом, катализируют несколько этапов этого цикла в митохондриальном матриксе. Мочевина образуется лишь в некоторых органах, таких как печень, и ферменты цикла мочевины синтезируются и переходят в митохондрии только в этих органах. Кроме того, дыхательные ферментные комплексы, входящие в состав внутренней митохондриальной мембраны, у млекопитающих содержат несколько тканеспецифических субъединиц, которые кодируются ядром и, вероятно, действуют как регуляторы переноса электронов. Например, у некоторых людей с наследственным заболеванием мышц одна из субъединиц цитохромоксидазы дефектна; поскольку эта субъединица специфична для скелетных мышц, волокна сердечной мышцы у этих людей функционируют нормально, что позволяет таким больным выживать. Как и следовало ожидать, тканеспецифические различия свойственны и хлоропластным белкам, кодируемым ядерными генами.

Рассмотрим теперь, каким образом специфические цитоплазматические белки переносятся в митохондрии и хлоропласты; более детально этот вопрос обсуждается в гл. 8.

7.5.14. Перенос белков в митохондрии и хлоропласты требует затраты энергии [59]

Большая часть белков, содержащихся в митохондриях и хлоропластах, импортируется этими органеллами из цитозоля (разд. 8.4). В связи с этим возникают два вопроса: как клетка направляет белки к надлежащей органелле и каким образом эти белки проникают в нее?

Частичный ответ был получен при изучении транспорта малой субъединицы (S) рибулозобисфосфат-карбоксилазы в строму хлоропласта. Если мРНК, выделенную из цитоплазмы одноклеточной водоросли *Chlamydomonas* или из листьев гороха, ввести в качестве матрицы в белок-синтезирующую систему in vitro, то одним из многих образующихся белков будет предшественник S-белка, называемый про-S, который больше S на 50 аминокислотных остатков. При инкубации белка про-S с интактными хлоропластами он проникает в органеллы и превращается там под действием эндопептидазы в S-белок. Затем этот S-белок связывается с большой субъединицей рибулозобисфосфат-карбоксилазы, синтезируемой на рибосомах хлоропласта, и образует с нею в строме активный фермент. Перенос белка про-S в хлоропласт, как и следовало ожидать для процессов этого типа, требует затраты энергии, которую доставляет гидролиз АТР (разд. 8.4.7).

Сходным образом осуществляется и транспорт белков внутрь митохондрий. Если очищенные митохондрии дрожжей инкубировать с клеточным экстрактом, содержащим только что синтезированные радиоактивные дрожжевые белки, то можно наблюдать, что митохондриальные белки, кодируемые ядерным геномом, избирательно включаются в митохондрии - точно так же, как это происходит в интактной клетке. При этом белки наружной и внутренней мембран, матрикса и межмембранного пространства находят свой путь к соответствующему компартменту митохондрии (см. рис. 8-30).

По-видимому, транспорт белков через мембраны митохондрий и хлоропластов происходит в специальных *контактных зонах,* где внутренняя и наружная мембраны соединяются (рис. 7-73). Белки приходят сюда в форме предшественников, содержащих особый сигнальный пептид. Для того чтобы транспортируемый белок мог быть перенесен в органеллу в такой зоне, его пептидная цепь должна развернуться (см. разд. 8.4.4).

7.5.15. Хлоропласты сами синтезируют большую часть своих липидов, а митохондрии в основном получают их из цитозоля [60]

Помимо нуклеиновых кислот и белков для построения новых митохондрий и хлоропластов нужны липиды. Все необходимые хлоропластам липиды обычно образуются в самих органеллах. В листьях шпината, например, синтез всех жирных кислот клетки происходит в хлоропластах, и только образование ненасыщенных связей в их молекулах - в других местах. Даже важнейшие гликолипиды хлоропластов образуются в них самих.

В отличие от этого митохондрии получают большую часть своих липидов извне. В животных клетках фосфолипиды фосфатидилхолин и фосфатидилсерин синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и затем переходят в наружную мембрану митохондрий. Полагают (хотя это еще не доказано), что в процессе переноса участвуют специальные белки (разд. 8.6.15), а затем липиды включаются во внутреннюю мембрану - по-видимому, в местах контакта двух мембран. Помимо декарбоксилирования получаемого извне фосфатидилсерина до фосфати-

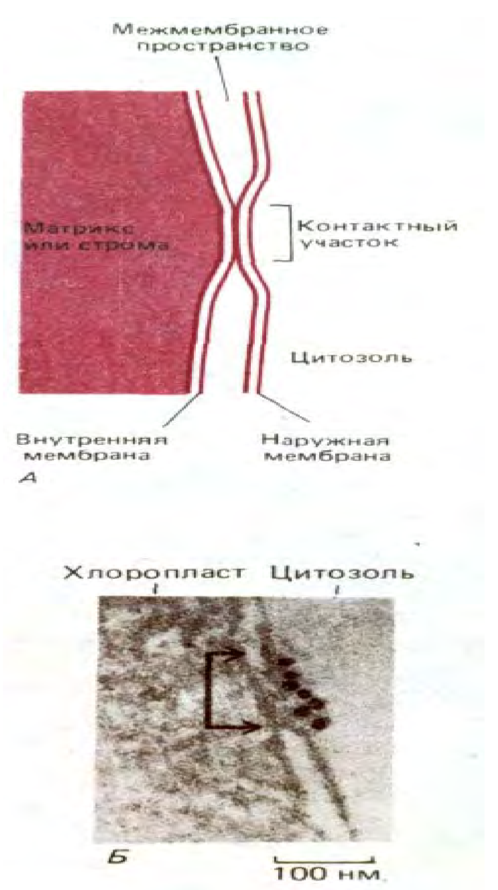


Рис. 7-73. Контактные участки. *А.* Схематическое изображение небольшой части митохондрии или хлоропласта, содержащей контактную область мембраны. Видимо, такие области участвуют в избирательном переносе белков в органеллу. Недавно контактные участки (называемые также контактными зонами) были выделены, и их специфические белковые компоненты в настоящее время изучаются. Через эти зоны переносятся белки, кодируемые клеточным ядром и синтезируемые в цитозоле. *Б.* Электронная микрофотография небольшого участка хлоропласта гороха, в котором контактная область (показана стрелками) помечена коньюгатами антител с золотом, которые, как полагают, связываются интегральным мембранным белком, участвующим в транспорте белков. (Из D. Pain, J. S. Kanwar, G. Blobel, Nature, 331, 232-237, 6, 1988.)

дилэтаноламина, митохондрии сами катализируют превращение приносимых в органеллу липидов в кардиолипин. Кардиолипин представляет собой «двойной» фосфолипид, содержащий четыре остатка жирной кислоты; этот липид содержится главным образом во внутренней мембране митохондрии, где составляет около 20% всех липидов.

7-38

7.5.16. Митохондрии и хлоропласты, вероятно, произошли от эндосимбиотических бактерий [61]

Как уже говорилось в гл. 1, «прокариотический» характер генетической системы органелл, особенно ярко выраженный у хлоропластов, позволяет предполагать, что митохондрии и хлоропласты произошли от бактерий, некогда поглощенных путем эндоцитоза. Согласно этой **эндосимбиотической гипотезе,** клетки эукариот в начале своего эволюционного пути были анаэробными организмами без митохондрий и хлоропластов, а затем вступили в прочный симбиоз с бактериями и приспособили их систему окислительного фосфорилирования для своих нужд (рис. 7-74). Полагают, что событие, приведшее к появлению митохондрий, произошло 1,5 млрд. лет назад, когда в атмосферу поступило значительное количество кислорода, еще до разделения линий животных и растений (см. рис. 7-61). Вероятно, хлоропласты растений и водорослей появились позднее в результате другого эндосимбиоза, когда клеткой были захвачены фотосинтезирующие бактерии, выделяющие молекулярный кислород. Обычно предполагают, что произошло по меньшей мере три независимых события этого рода, так как тогда можно было бы объяснить различие пигментов и других особенностей у современных высших растений и у зеленых, бурых и красных водорослей (см. рис. 7-62).

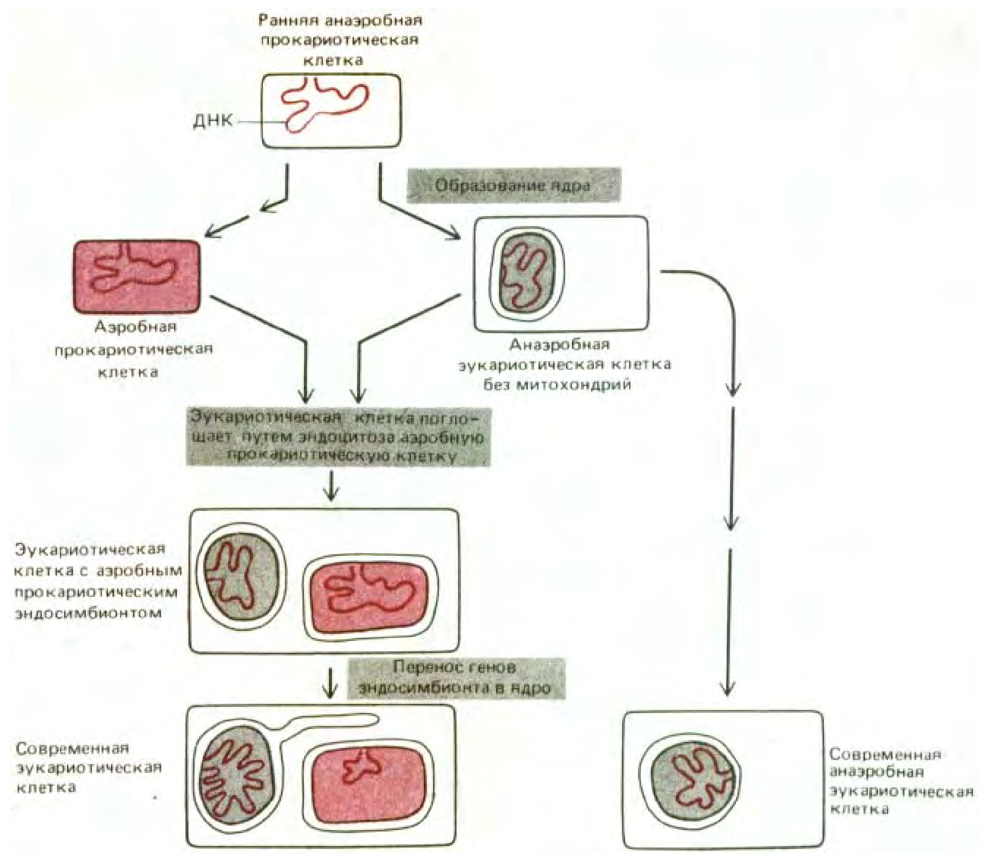


Рис. 7-74. Предполагаемый путь эволюционного происхождения митохондрий (выделены цветом). Иногда считают, что все митохондрии произошли от одного и того же предка, однако митохондрии таких эволюционно далеких друг от друга форм, как трипаносомы и эвгленовые (см. рис. 1-16), могли возникнуть в результате независимых эндосимбиозов. Микроспоридии (Microsporidia, Protozoa) - современные анаэробные одноклеточные эукариоты, обитающие в кишечнике многих животных, не имеют митохондрий. Поскольку анализ нуклеотидной последовательности рРНК этих микроорганизмов показал, что в эволюционном отношении они очень далеки от всех других известных эукариот, предполагают, что предки микроспоридий тоже были анаэробами и были сходны с тем эукариотическим организмом, который впервые поглотил предка митохондрий (разд. 1.2.6).

Так как большинство генов, кодирующих белки современных митохондрий и хлоропластов, находится в ядерном геноме, можно думать, что в ходе эволюции эукариот значительная часть генов органелл была перенесена в ядерную ДНК. Это позволило бы объяснить, почему некоторые из ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, сходны с генами бактерий. Так, например, у курицы N-концевая аминокислотная последовательность митохондриального фермента *супероксиддисмутазы* гораздо больше похожа на соответствующий сегмент супероксиддисмутазы бактерий, чем на N-концевой участок того же фермента, выделенного из цитозоля тех же эукариотических клеток. Еще одним указанием на то, что подобные переносы участков происходили в ходе эволюции, служат обнаруженные в ядерном геноме некодирующие последовательности ДНК, имеющие, вероятно, недавнее митохондриальное происхождение; очевидно, что эти последовательности были интегрированы в ядерный геном как «балластная» ДНК.

Какой же тип бактерий дал начало митохондриям? Расшифровка полной аминокислотной последовательности и трехмерный рентгеноструктурный анализ цитохромов типа *c* из различных бактерий выявили близкое сходство этих белков между собой и с цитохромом *c* дыхательной цепи митохондрий растительных и животных клеток. На основе этих и других биохимических данных было предложено эволюционное древо, изображенное на рис. 7-62. По-видимому, митохондрии произошли от особого рода пурпурных фотосинтезирующих бактерий, которые утратили способность к фотосинтезу и сохранили только дыхательную цепь. Однако до сих пор не ясно, все ли митохондрии (так же как и хлоропласты) возникли в результате одного единственного случая эндосимбиоза. Хотя митохондрии простейших имеют отчетливо выраженные прокариотические свойства, некоторые из них достаточно отличаются от митохондрий растительных и животных клеток, чтобы можно было предположить их независимое происхождение.

7.5.17. Для чего митохондриям и хлоропластам собственная генетическая система? [62]

Почему митохондриям и хлоропластам необходима собственная генетическая система, тогда как другие органеллы, например пероксисомы и лизосомы, ее не имеют? Этот вопрос совсем не тривиален, так как поддержание отдельной генетической системы дорого обходится клетке: специально для этих целей в ядерном геноме должно быть закодировано более 90 белков, в том числе много рибосомных белков, аминоациал-тРНК-синтетазы, ДНК- и РНК-полимеразы, ферменты процессинга и модификации РНК (рис. 7-75). Большинство изученных белков из митохондрий и хлоропластов отличаются по аминокислотной последовательности от своих аналогов из других частей клетки, и есть основание полагать, что в этих органеллах сравнительно мало таких белков, которые могли бы встретиться еще где-нибудь. Это означает, что только для поддержания генетической системы каждого вида энергетических органелл в ядерном геноме должно быть не менее 90 дополнительных генов. Причины такого «расточительства» неясны, и надежда на то, что разгадка будет найдена в нуклеотидных последовательностях митохондриальной ДНК, не оправдалась. Трудно представить себе, почему образующиеся в митохондриях белки должны непременно синтезироваться там, а не в цитозоле.

Одно время предполагалось, что некоторые из синтезируемых внутри органеллы белков слишком гидрофобны, чтобы пройти сквозь ее мембрану из цитозоля. Однако полученные позже данные показали, что такое объяснение неправдоподобно. Во многих случаях даже высоко-

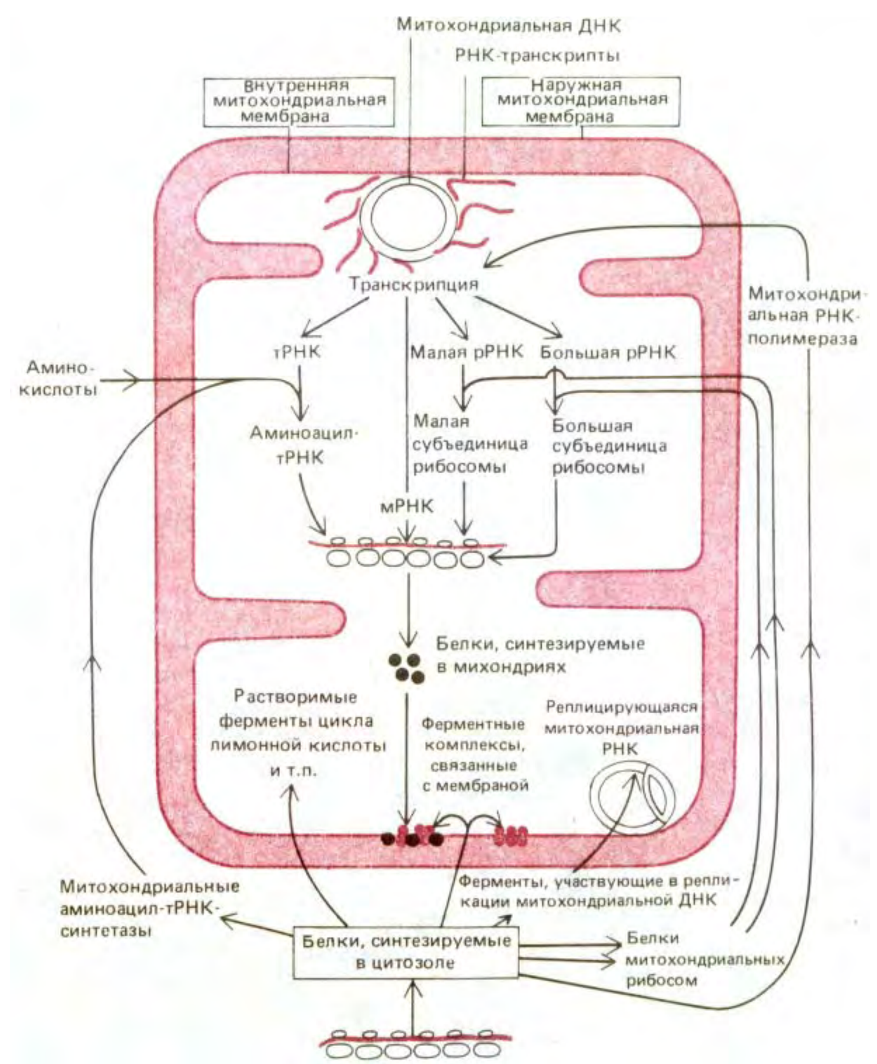


Рис. 7-75. Белки, синтезируемые в цитозоле и переносимые затем в митохондрию, не только составляют основную часть всех белков органеллы, но и играют важную роль в митохондриальной системе белкового синтеза. Из компонентов этой системы сама митохондрия синтезирует только мРНК, рРНК и тРНК.

гидрофобные субъединицы синтезируются в цитозоле. Более того, хотя отдельные белковые субъединицы различных митохондриальных ферментных комплексов весьма консервативны в ходе эволюции, места их синтеза изменяются. Различную локализацию генов, кодирующих субъединицы функционально эквивалентных белков у разных организмов, трудно объяснить с помощью какой бы то ни было гипотезы, постулирующей какие-то эволюционные преимущества современных генетических систем митохондрий и хлоропластов.

Возможно, генетические системы этих органелл представляют собой эволюционный тупик. В рамках эндосимбиотической гипотезы это означает, что процесс переноса генов эндосимбионта в ядерный геном хозяина прекратился раньше, чем был завершен; может быть, в случае митохондрий эта остановка была результатом сравнительно недавних изменений в генетическом коде митохондрий. Такие изменения, вероятно, сделали бы оставшиеся митохондриальные гены функционально неактивными в случае их переноса в ядро.

Заключение

Рост и деление митохондрий и хлоропластов контролируются двумя отдельными генетическими системами: геномом самой органеллы и ядерным геномом. Большая часть белков этих органелл закодирована в ядер-

ной ДНК, синтезируется в цитозоле и затем переходит в органеллу. Однако некоторые белки митохондрий и хлоропластов и все их РНК кодируются в ДНК самих органелл и в них же синтезируются. Геном митохондрий человека содержит около 16500 пар нуклеотидов и кодирует 2 рибосомные РНК, 22 транспортные РНК и 13 различных полипептидных цепей. Геном хлоропластов примерно в 10 раз больше генома митохондрий человека и содержит около 120 генов. Однако преобладающая роль в биогенезе органелл обоих типов принадлежит ядру: это подтверждается тем, что даже у таких мутантов, у которых отсутствует функционирующий геном органелл, частично функционирующие органеллы образуются в нормальном количестве.

Рибосомы хлоропластов очень сходны с бактериальными рибосомами, тогда как рибосомы митохондрий несколько больше отличаются от последних; поэтому проследить происхождение митохондрий сложнее. Однако сходство между белками дает основание предполагать, что те. и другие органеллы произошли от бактерий, вступивших в устойчивый симбиоз (в качестве эндосимбионтов) с какими-то примитивными эукариотическими клетками; как полагают, митохондриям дали начало пурпурные бактерии, а хлоропластам (позднее) - цианобактерии или близкие к ним организмы. Хотя многие гены этих древних бактерий все еще используются для синтеза белков органеллы, большая их часть по неясным причинам включилась в ядерный геном, где они кодируют ферменты, которые сходны с бактериальными и синтезируются на рибосомах в цитозоле, а затем переходят в органеллу.

Литература

Общая

Becker W.M. The World of the Cell, pp. 117-284. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1986.
Ernster L. ed. Bioenergetics. New York, Elsevier, 1984.
Harold F. M. The Vital Force: A Study of Bioenergetics. New York, W. H. Freeman, 1986.
Lehninger A.L. Principles of Biochemistry, Chapters **16**, 17, 23. New York, Worth, 1982.
Nicholls D. G. Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory. New York, Academic Press, 1982.
Stryer L. Biochemistry, 3rd ed., Chapters 16, 17 and 22. New York, W. H. Freeman, 1988.

Цитируемая

1. *Ernster L., Schatz G.* Mitochondria: a historical review. J. Cell Biol., **91,** 227s-255s, 1981.
Fawcett D. W. The Cell, 2nd ed., pp. 410-485. Philadelphia, Saunders, 1981.
Harold F. M. The Vital Force: A Study of Bioenergetics, Chapter 7. New York, W.H. Freeman, 1986.
Tzagoloff A. Mitochondria. New York, Plenum, 1982.
2. *DePierre J. W., Ernster L.* Enzyme topology of intracellular membranes. Annu. Rev. Biochem.**,** **46**, 201-261, 1977.
Srere P. A. The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment. Trends Biochem. Sci., **7**, 375-378, 1982.
3. *Krstic R. V.* Ultrastructure of the Mammalian Cell, pp. 28-57. New York, Springer-Verlag, 1979.
Pollak J. K., Sutton R. The differentiation of animal mitochondria during development. Trends Biochem. Sci., **5**, 23-27, 1980.
4. *Geddes R.* Glycogen: a metabolic viewpoint. Biosci. Rep., **6**, 415-428, 1986.
McGilvery R. W. Biochemistry: A Functional Approach, 3rd ed. Philadelphia, Saunders, 1983.
Newsholme E.A., Start C. Regulation in Metabolism. New York, Wiley, 1973.
5. *Baldwin J.E., Krebs H.* The evolution of metabolic cycles. Nature, **291,** 381-382, 1981.
Krebs H. A. The history of the tricarboxylic acid cycle. Perspect Biol. Med., **14**, 154-170, 1970.
Reed I. J., Damuni Z., Merryfleld M. L. Regulation of mammalian pyruvate and

branched-chain α-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. Curr. Top. Cell Regul., **27,** 41-49, 1985.
Williamson J. R., H. Cooper R. H. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. FEBS Lett., Suppl. **117**, K73-K85, 1980.

6. *Mitchell P.* Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, **191,** 144-148, 1961.
Racker E. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. Fed. Proc., **39**, 210-215, 1980.
7. *Hatefi Y.* The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem., **54,** 1015-1070. 1985.
8. *Nicholls D. G.* Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory, Chapter 3. New York, Academic Press, 1982.
Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E. Biochemistry: A Problems Approach, 2nd ed. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings 1981. (See problems, Chapter 9, 12 and 14).
9. *Al-Awgati A.* Proton-translocating ATPase. Annu. Rev. Cell Biol, **2,** 179-199, 1986.
Hinkle P. C., McCarty R.E. How cells make ATP. Sci. Am., **283(3)**, 104-123, 1978.
10. *Durand R., Briand Y., Touraille S., Alziari S.* Molecular approaches to phosphate transport in mitochondria. Trends Biochem. Sci., **6**, 211-214, 1981.
Klingenberg M. The ADP, ATP shuttle of the mitochondrion. Trends Biochem. Sci., **4**, 249-252, 1979.
LaNoue K. F., Schoolwerth A. C. Metabolite transport in mitochondria. Annu. Rev. Biochem., **48**, 871-922, 1979.
11. *Eisenberg D., Crothers D,* Physical Chemistry with applications to the Life Sciences, Chapters 4 and 5. Menlo Park CA, Bemjamin-Cummings, 1979.
12. *Hatefi Y.* The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem., **54**, 1015-1069, 1985.
Wikstrom M., Saraste M. The mitochondrial respiratory chain. In: Bioenergetics (L. Ernster ed.), pp. 49-94. New York, Elsevier, 1984.
13. *Racher E.* A New Look at Mechanisms in Bioenergetics. New York, Academic Press, 1976. (A personal account of the concepts and history).
14. *Awzel L. M., McKinney M., Narayanan P., Pedersen P. L.* Structure of the mitochondrial F_1 ATPase at 9-A resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5852-5856, 1982.
Futai M., Kanazawa H. Structure and function of protontranslocating adenosine triphosphatase (F_0F_1): biochemical approaches. Microbiol. Rev., **47,** 285-312, 1983.
Racker E., Stoeckenius W. Reconstruction of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. J. Biol. Chem., **249**, 662-663, 1974.
Schneider E., Altendorf K. The proton-translocating portion (F_0) of the E. coli. ATP synthase. Trends.Biochem. Sci., **9**, 51-53, 1984.
15. *Hammes G. G.* Mechanism of ATP synthesis and coupled proton transport: studies with purified chloroplast coupling factor. Trends Biochem. Sci., **8**, 131-134, 1983.
Ogawa S., Lee T. M. The relation between the internal phosphorylation potential and the proton motive force in mitochondria during ATP synthesis and hydrolysis. J. Biol. Chem., **259,** 10004-10011, 1984.
Pederson P. L., Carafoli E. Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. Trends Biochem. Sci**.**, **12**, 186-189, 1987.
Senior A. E. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. Physiol. Rev., **68**, 177-231, 1988.
16. *Fillingame R. H.* The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. Annu. Rev. Biochem., **49**, 1079-1113, 1980.
17. *Chance B., Williams G.R.* A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. Nature, **176**, 250-254, 1955.
Dickerson R. E. The structure and history of an ancient protein. Sci. Am., **226(4),** 58-72, 1972. (The conformation and evolution of cytochrome c).
Keilin D. The History of Cell Respiration and Cytochromes. Cambridge U. K., Cambridge University Press, 1966.
Spiro T.G. ed. Iron-Sulfur Proteins. New York, Wiley-Interscience, 1982.
18. *Capaldi R.A., Darley-Usmar V., Fuller S., Millet F.* Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. FEBS Lett., **138**, 1-7, 1982.
Casey R. P. Membrane reconstruction of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, **768**, 319-347, 1984.
Leonard K., Haiker H., Weiss H. Three-dimensional structure of NADH: ubiquinone reductase (complex I) from Neurospora mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. J. Mol. Biol., **194,** 277-286, 1987.
Weiss H., Linke P., Haiker H., Leonard K. Structure and function of the mitochondrial ubiquinol: cytochrome c reductase and NADH: ubiquinone reductase. Biochem. Sci. Trans., **15,** 100-102, 1987.

19. *Hackenbrock C.R.* Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane. Trends Biochem. Soc. Trans., **15**, 151-154, 1981.
20. *Dutton P. L., Wilson D. F.* Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. Biochim. Biophys. Acta, **346,** 165-212, 1974.
Hamamoto T., Carrasco N., Matsushita K., Kabak H. R., Montal M. Direct measurement of the electrogenic activity of D-type cytochrome oxidase from *E. coli* reconstituted into planar lipid bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82,** 2570-2573, 1985.
Lehninger A. L. Bioenergetics: The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2nd ed. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1971.
21. *Prince R.C.* The proton pump of cytochrome oxidase. Trends Biochem. Sci.**, 13,** 159-160, 1988.
Slater E. C. The Q Cycle, an ubiquitous mechanism of electron transfer. Trends Biochem. Sci., **8,** 239-242, 1983.
22. *Hanstein W. G.* Uncoupling of oxidative phosphorylation. Trends Biochem. Sci., **1,** 65-67, 1976.
23. *Brand M. D., Murphy M. P.* Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. Biol. Rev. Cambridge Philosophic. Soc.**, 62**, 141-193, 1987.
Erecinska A., Wilson D. F. Regulation of cellular energy metabolism. J. Membr. Biol., **70,** 1-14, 1982.
Racker E. A New Look at Mechanisms in Bioenergetics. New York. Academic Press, 1976.
24. *Klinyerberg M.* Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocators from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. Ann. N. Y. Acad. Sci., **456,** 279-288, 1985.
Nicholls D.G., Rial E. Brown fat mitochondria. Trends Biochem. Sci., **9,** 489-491, 1984.
25. *Gottskalk G.* Bacterial Metabolism, 2nd ed. New York, Springer-Verlag, 1986.
MacNab R.M. The bacterial flagellar motor. Trends Biochem. Sci., **9,** 185-189, 1984.
Neidhardt F. C. et al, eds. Escherichia coli and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology. Washington DC, American Society for Microbiology, 1987.
Skulachev V.P. Sodium bioenergetics. Trends Biochem. Sci., **9,** 483-485, 1984.
Thauer R., Jungermann K., Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev., **41**, 100-180, 1987.
26. *Bogorad L.* Chloroplasts. J. Cell. Biol., **91**, 256s-270s, 1981. (A historical review).
Clayton R. K. Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns. Cambridge U.K., Cambridge University Press 1980 (Excellent general treatment).
Haliwell B. Chloroplast Metabolism - The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells. Oxford U.K., Clarendon, 1981.
Hoober J.K. Chloroplasts. New York, Plenum, 1984.
27. *Cramer W.A., Widger W.R., Herrmann R.G., Trebst A.* Topography and function of thylakoid membrane proteins. Trends Biochem. Sci., **10**, 125-129, 1985.
Miller K.R. The photosynthetic membrane. Sci. Am.**, 241(4)**, 102-113, 1979.
28. *Akazawa T., Takabe T., Kobayashi H.* Molecular evolution of ribulose-l,5-bisphos-phate carboxylase/oxygenase (RuBisCO). Trends Biochem. Sci., **9**, 380-383, 1984.
Barber J. Structure of key enzyme refined. Nature, **325**, 663-664, 1987.
Lorimer G.H. The carboxylation and oxygenation of ribulose-l,5-biphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. Annu. Rev. Plant Physiol., **32**, 349-383, 1981.
29. *Bassham J.A.* The path of carbon in photosynthesis. Sci. Am., **206(6),** 88-100, 1962.
Preiss J. Starch, sucrose biosynthesis and the partition of carbon in plants are regulated by orthophosphate and triose-phosphates. Trends Biochem. Sci., **9,** 24-27, 1984.
30. *Bjorkman J., Berry J.* High-efficiency photosynthesis. Sci. Am. **229(4)**, 80-93, 1973. (C^4 plants).
Cholelet R. The biochemistry of photorespiration. Trends Biochem. Sci., **2**,155-159, 1977.
Edwards G., Walker D. C^3, C^4 Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis. Berkeley, University of California Press, 1983.
Heber U., Krause G.H. What is the physiological role of photorespiration? Trends Biochem. Sci.**, 5**, 32-34, 1980.
31. *Clayton R. K.* Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns. Cambridge U.K., Cambridge University Press 1980.
Parson W. W. Photosynthesis and other reactions involving light. In: Biochemistry (G. Zubay ed.), 2nd ed., pp. 564-597. New York, Macmillan, 1988.
32. *Barber J.* Photosynthetic reaction centres: a common link. Trends Biochem. Sci., **12**, 321-326, 1987.
Govindjee, Govindjee R. The absorption of light in photosynthesis. Sci. Am

231(6)68-82, 1974.
Li J. Light-harvesting chlorophyll a/b-proteins three-dimensional structure of a reconstituted membrane lattice in negative stain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82,** 386-390, 1985.
Zuber J. Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria, and red algae. Trends Biochem. Sci., **11**, 414-419, 1986.
33. *Deisenhofer J., Epp J., Miki K., Huber R., Michel H.* Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodopseudomonas viridis at 3A resolution. Nature, **318**, 618-624, 1985.
Deiaenhofer J., Michel H., Huber R. The structural basis of photosynthetic light reactions in bacteria. Trends Biochem. Sci., **10**, 243-248, 1985.
Knaff D. B. Reaction centers of photosynthetic bacteria. Trends Biochem. Sci., **13,** 157-158, 1988.
Michel H., Epp D., Deisenhofer J, Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction center from Rhodopseudomonas viridis. EMBO J., **5**, 2445-2451, 1986. (Three-dimensional structure by x-ray diffraction).
34. *Govindjee ed.* Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria. New York, Academic Press, 1982. (Two volumes of review articles at an advanced level.)
Nugent J. H. A. Photosynthetic electron transport in plants and bacteria. Trends Biochem. Sci.**, 9,** 354-357, 1984.
Scolnik P. A., Mans B. L. Genetic research with photosynthetic bacteria. Annu. Rev. Microbiol., **41**, 703-726, 1987.
35. *Blankenship R.E., Prince R.C.* Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis. Trends Biochem. Sci., **10,** 382-383, 1985.
Prince R. C. Manganese at the active site of the chloroplast oxygen-evolving complex. Trends Biochem. Sci., **11**, 491-492, 1986.
36. *Anderson J. M.* Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. Annu. Rev. Plant Physiol., **37**, 93-136, 1986.
Carrillo N., Vallejos R. H. The light-dependent modulation of photosynthetic electron transport. Trends Biochem. Sci., **8**, 52-56, 1983.
Miller K. R., Lyon M. K. Do we really know why chloroplast membranes stack? Trends Biochem. Sci., **10**, 219-222, 1985.
37. *Hinkle P. C., McCarty R.E.* How cells make ATP. Sci. Am., **238(3),** 104-123, 1978.
Jagendorf A. T. Acid-base transitions and phosphorylation by chloroplasts. Fed. Proc.**, 26**, 1361-1369, 1967.
38. *Flugge U. I., Heldt H. W.* The phosphate-triose phosphate-phosphoglycerate translocator of the chloroplast. Trends Biochem. Sci., **9**, 530-533, 1984.
Heber U., Heldt H. W. The chloroplast envelope: structure, function and role in leaf metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol., **32,** 139-168, 1981.
39. *Raven J. A.* Division of labor between chloroplast and cytoplasm. In: The Intact Chloroplast (J. Barber ed.), pp. 403-443, Amsterdam, Elsevier, 1976.
40. *Wilson T. H., Lin E. C. C.* Evolution of membrane bioenergetics. J. Supramol. Struct., **13,** 421-446, 1980.
Woese C.R. Bacterial Evolution. Microbiol. Rev., **51**, 221-271, 1987.
41. *Gest H.* The evolution of biological energy-transducting systems. FEBS Microbiol. Lett, **7**, 73-77, 1980.
Gottschalk G. Bacterial Metabolism, 2nd ed. New York, Springer-Verlag, 1986. (Chapter 8 covers fermentations).
Miller S. M., Orgel L. E. The Origins of Life on the Earth. Englewood Cliffs, NJ. Prentice-Hall, 1974.
42. *Danson M. J.* Archaebacteria: the comparative enzymology of their metabolic pathways. Adv. Microb. Physiol.**, 29,** 165-231, 1988.
Knowles C.J., ed. Diversity of Bacterial Respiratory Systems Vol. 1. Boca Raton FL. CRC Press, 1980.
43. *Clayton R. K., Sistrom W. R. eds.* The Photosynthetic Bacteria. New York, Plenum, 1978.
Deamer D. W. ed. Light Transducting Membranes: Structure, Function and Evolution. New York, Academic Press, 1978.
Gromet-Elhanan Z. Electrochemical gradients and energy coupling in photosynthetic bacteria. Trends Biochem. Sci.**, 2**, 274-277, 1977.
Olson J. M., Pierson B. K. Evolution of reaction centers in photosynthetic prokaryotes. Int. Rev. Cytol., **108**, 209-248, 1987.
44. *Dicherson R. E.* Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. Sci. Am., **242(3),** 136-153, 1980.
Gabellini N. Organization and structure of the genes for the cytochrome b/c complex in purple photosynthetic bacteria. A phylogenetic study describing the homology of the b/ci subunits between prokaryotes, mitochondria, and chloroplasts. J. Bioenerg. Biomembr., **20**, 59-83, 1988.
Schopf J. W., Hayes J. M., Walter M. R. Evolution of earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In: Earth's Earliest Biosphere: Its Origin

and Evolution (J. W. Schopf ed.), pp. 361-384. Princeton, NJ. Princeton University Press, 1983.
45. *Attardi G., Schatz* G. Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell. Biol., **4**, 289-333, 1988.
Ellis R. J. ed. Chloroplast biogenesis. Cambridge U. K., Cambridge University Press, 1984.
46. *Clayton D.A.* Replication of animal mitochondrial DNA. Cell **28**, 693-705, 1982.
Posakony J.W., England J. M., Attardi G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. J. Cell Biol., **74**, 468-491, 1977.
47. *Attardi G.; Borst P., Slonimski P. P.* Mitochondrial Genes. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
Borst P., Grivell L. A., Groot G. S. P. Orga elle DNA. Trends Biochem. Sci., **9**, 128-130, 1984.
Palmer J. D. Comparative organization of chloroplast genomes. Annu. Rev. Genet., **19**, 325-354, 1985.
48. *Grivell L. A.* Mitochondrial DNA. Sci. Am., **248(3)**, 60-73, 1983.
Hoober J.K. Chloroplasts. New York, Plenum, 1984.
49. *Ohyama K. et ah* Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. Nature, **322**, 572-574, 1986.
Rochaix J. D. Molecular genetics of chloroplasts and mitochondria in the unicellular green alga *Chlamydomonas.* FEMS Microbiol. Rev., **46**, 13-34, 1987.
Shinozaki K. et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J., **5**, 2034-2049, 1986.
Umesono K., Ozeki J. Chloroplast gene organization in plants. Trends Genet., **3**, 281-287, 1987.
50. *Anderson S. et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, **290**, 457-465, 1981.
Bibb M. J., Van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. Cell, **26,** 167-180, 1981.
Breitenberger C.A., RajBhandary U.L. Some highlights of mitochondrial research based on analysis of Neurospora crassa mitochondrial DNA. Trends Biochem. Sci., **10**, 478-482, 1985.
Fox T.D. Natural variation in the genetic code. Annu. Rev. Genet, **21,** 67-91, 1987.
51. *Attardi G.* Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. Int. Rev. Cytol., **93,** 93-145, 1985.
Wilson A. The molecular basis of evolution. Sci. Am., **253(4)** 164-173, 1985.
52. *Levings C.S.* The plant mitochondrial genome and its mutants. Cell, **32**, 659-661, 1983.
Mulligan R. M., Walbot V. Gene expression and recombination in plant mitochondrial genomes. Trends Genet, **2**, 263-266, 1986.
Newton K. J. Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39**, 503-532, 1988.
53. *Clayton D. A.* Transcription of the mammalian mitochondrial genome. Annu. Rev. Biochem., **53**, 573-594, 1984.
Gruissem W., Barken A., Deng S., Stern D. Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA in higher plants. Trendes Genet., **4**, 258-262, 1988.
Mullet J. E. Chloroplast development and gene expression. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39**, 475-502, 1988.
Tabak H. F., Grivell L. A. RNA catalysis in the excision of yeast mitochondrial introns. Trends Genet, **2**, 51-55, 1986.
54. *Birky C. W., Jr.* Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. Annu. Rev. Genet, **12**, 471-512, 1978.
55. *Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C.* Material inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 6715-6719, 1980.
56. *Bernardi G.* The petite mulation in yeast. Trends Biochem. Sci., **4**, 197-201, 1979.
Locker J., Lewin A., Rabinowitz M. The structure and organization of mitochondrial DNA from petite yeast. Plasmid, **2**, 155-181, 1979.
Montisano D. P., James T. W. Mitochondrial morphology in yeast with and without mitochondrial DNA. J. Ultrastruct. Res., **67**, 288-296, 1979.
57. *Attardi G., Schatz G.* Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol., **4**, 289-333, 1988.
Fox T. D. Nuclear gene products required for translation of specific mitochondrially coded mRNAs in yeast. Trends Genet, **2**, 97-99, 1986.
Tzagoloff A., Myers A. M. Genetics of mitochondrial biogenesis. Annu. Rev, Biochem., **55**, 249-285, 1986.
58. *Capaldi R. A.* Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. Trends Biochem. Sci., **13**, 144-148, 1988.
DiMauro S. et al. Mitochondrial myopathies. J. Inherited Meta. Dis., **10(Suppl 1),** 113-128, 1987.
59. *Chua N.-H., Schmidt G. W.* Post-translational transport into intact chloroplasts of

a precursor to the small subunit of ribulose-l,5-bisphosphate carboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 6110-6114, 1978.
Douglas M. G., McCammon M. T., Vassarotti A. Targeting proteins into mitochondria. Microbiol. Rev., **50,** 166-178, 1986.
Keegstra K., Bauerle C. Targeting of proteins into chloroplasts. Bioassays, **9**, 15-19, 1988.
Schmidt G. W., Mishkind M. L. The transport of proteins into chloroplasts. Annu. Rev. Biochem., **55**, 879-912, 1986.
60. *Bishop W. R., Bell R. M.* Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. Annu. Rev. Cell Biol, **4**, 579-611, 1988.
61. *Cavalier-Smith T.* The origin of eukaryotic and archaebacterial cells. Ann. N.Y. Acad. Sci., **503**, 17-54, 1987.
Butow B. A., Doeherty R., Parikh V. S. A path from mitochondria to the yeast nucleus. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **319,** 127-133, 1988.
Gellissen G., Michaelis G. Gene transfer: Mitochondria to nucleus. Ann. N. Y. Acad. Sci., **503,** 391-401, 1987.
Margulis 1. Symbiosis in Cell Evolution. New York, W. H. Freeman, 1981.
Schwartz R. M., Dayhoff M. O. Origins of prikaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. Science, **199,** 395-403, 1978.
Whatley f. M., John P., Whatley F. R. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), **204,** 165-187, 1979.
62. *von Heijne G.* Why mitochondria need a genome. FEBS Lett., **198,** 1-4, 1986.

Оглавление

2.5.5. Реакции компартментализованы как на уровне клеток, так и на уровне всего организма 110

Заключение 111

Литература 112

3. Макромолекулы: структура, форма и информационные функции 113

3.1. Процессы молекулярного узнавания 113

3.1.1. Специфические взаимодействия макромолекулы

7.4.4. Первый атмосферный кислород был, вероятно, продуктом более сложных фотосинтетических электронтранспортных цепей цианобактерий 481

Заключение 483

7.5. Геномы митохондрий и хлоропластов 485

7.5.1. Число митохондрий и хлоропластов в клетке поддерживается путем их деления 486

7.5.2. В большинстве случаев геномы хлоропластов и митохондрий представлены кольцевыми молекулами ДНК 486

7.5.3. Митохондрии и хлоропласты обладают полноцен-

Содержание книги
Том 1

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва
1-Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Учебное издание

Брюс Албертс,
Деннис Брей,
Джулиан Льюис и др.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ
КЛЕТКИ

2-е издание, переработанное и дополненное
В 3-х томах
Том 1

Заведующая редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова,
Научный консультант редакции акад. Т. М. Турпаев,
Ведущие редакторы М. Р. Погосбекова, Ю. И. Лашкевич
Редакторы М. С. Карнюшина, Н. Ю. Плавинская
Художник Е. И. Волков
Художественные редакторы А. Е. Волков, Л. М. Аленичева
Технический редактор М. А. Страшнова
Корректор Т. М. Подгорная

ИБ № 7577

Лицензия Л.Р № 010174 от 22.01.92 г.

Сдано в набор 03.02.92. Подписано к печати 04.01.94.
Формат 84 x $108^{1}/_{16}$ - Бумага офсетная. Печать офсетная.
Гарнитура тайме. Объем 16,25 бум. л. Усл. печ. л. 54,60.
Усл. кр.-отт. 108,78. Уч.-изд. л. 55,53.
Изд. № 4/7791. Тираж 10000 экз. Зак. 1321. С 023

Издательство «Мир»
Комитета Российской Федерации по печати
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Можайский полиграфкомбинат
Комитета Российской Федерации по печати
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93

Брюс Албертс

Получил степень доктора философии в Гарвардском университете; в настоящее время — профессор кафедры биофизики и биохимии Медицинского отделения Калифорнийского университета в Сан-Франциско.

Деннис Брей

получил докторскую степень в Массачусетском технологическом институте и в настоящее время занимает должность старшего исследователя в отделе биофизики клетки Медицинского исследовательского совета при Кинг-Колледже в Лондоне.

Джулиан Льюис

получил ученую степень в Оксфордском университете; в настоящее время читает курс лекций на кафедре анатомии Кинг-Колледжа в Лондоне.

Мартин Рэфф

доктор медицины. Ученую степень получил в Университете Мак-Гилла; в настоящее время — профессор отделения зоологии Университетского колледжа в Лондоне.

Кейт Робертс

получил докторскую степень в Кембриджском университете и в настоящее время возглавляет кафедру биологии клетки в Институте Джона Иннеса в Норвиче.

Джеймс Д. Уотсон

получил степень доктора философии в Индианском университете; в настоящее время является директором лаборатории Колд-Спринг-Харбор. Он — автор книги «Молекулярная биология гена». В 1962 г. Дж. Д. Уотсон вместе с Френсисом Криком и Морисом Уилкинсом был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.